

**EFEITOS COMBINADOS DE CONTAMINANTES
QUÍMICOS E UM FATOR DE STRESS AMBIENTAL
EM *CARCINUS MAENAS***

ANA CATARINA DA SILVA MONTEIRO

Dissertação de Mestrado em Toxicologia e Contaminação Ambientais

2015

ANA CATARINA DA SILVA MONTEIRO

**EFEITOS COMBINADOS DE CONTAMINANTES QUÍMICOS E UM
FATOR DE STRESS AMBIENTAL EM *CARCINUS MAENAS***

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em
Toxicologia e Contaminação Ambientais
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de
Abel Salazar da Universidade do Porto.

Doutora Laura Guimarães
Investigadora Auxiliar
Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Doutora Ana Cristina Rocha
Pós-doutoramento
Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer às instituições que me acolheram, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP) e ao Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR). Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Projeto ECORISK (referência NORTE-07-0124-FEDER-000054), dentro do SR&TD Programa Integrado “MARVALOR – Building Research and Innovation Capacity for Improved Management and Valorization of Marine Resources”, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte ON.2 (O Novo Norte), ao abrigo do Quadro de Referência Estratégico Regional (QREN), através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), e pelo Fundo Estratégico UID/Multi/04423/2013, através de fundos nacionais disponibilizados pela FCT (Foundation for Science and Technology) e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) no âmbito do programa PT2020.



À Doutora Laura Guimarães e Doutora Cristina Rocha o meu sincero agradecimento pela orientação, apoio constante, disponibilidade e serenidade nos momentos mais difíceis. Agradeço ainda a todos os colegas de laboratório por toda a ajuda prestada ao longo deste tempo de trabalho. Aos meus colegas de mestrado o meu obrigado pela companhia e bons momentos proporcionados ao longo destes dois anos. À minha companheira de “viagem” ao longo deste percurso académico, Isabel, o meu obrigado pela amizade, apoio e companheirismo nos momentos bons e nos mais complicados. Aos meus amigos, mas claro em especial à Rita e Marlene, agradeço pela presença constante e sempre boa na minha vida, e porque sem vocês era tudo mais complicado. E por fim, mas o mais importante agradeço à minha família, em especial aos meus pais e à minha madrinha pelo constante incentivo, pelo esforço feito e por acreditarem sempre em mim. Espero um dia poder vir a retribuir de alguma forma tudo o que fazem por mim.

ÍNDICE

Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
Comunicações.....	xviii
1. Introdução.....	19
1.1. Estuários.....	19
1.2. <i>Carcinus maenas</i>	20
1.3. Biomarcadores de alerta precoce.....	22
1.4. Substâncias perigosas e nocivas.....	24
1.4.1. Acrilonitrilo.....	27
1.4.2. Anilina.....	29
1.5. Objetivos.....	30
2. Material e Métodos.....	32
2.1. Local de estudo e colheita dos organismos teste.....	32
2.2. Ensaio de exposição a acrilonitrilo e anilina.....	34
2.3. Ensaio de alimentação.....	35
2.4. Determinação de biomarcadores.....	36
2.4.1. Compostos, reagentes e equipamentos.....	36
2.4.2. Homogeneização de tecidos.....	37
2.4.3. Ensaio enzimáticos e peroxidação lipídica.....	37
2.4.4. Medição da concentração de proteína.....	38

2.5. Análises químicas.....	38
2.6. Análise de dados.....	39
3. Resultados.....	41
3.1. Análises químicas.....	41
3.2. Mortalidade.....	41
3.3. Biomarcadores de alerta precoce.....	42
3.3.1. Organismos do Tempo zero.....	42
3.3.2. Acrilonitrilo.....	43
3.3.3 Anilina.....	49
4. Discussão.....	55
4.1. Biomarcadores de alerta precoce.....	57
4.1.1. Parâmetro comportamental.....	57
Alimentação.....	57
4.1.2. Parâmetros bioquímicos.....	58
Neurotransmissão.....	58
Metabolismo energético.....	59
Biotransformação e defesas antioxidativas.....	60
Danos oxidativos.....	61
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	63
6. Referências.....	64

Lista de figuras

Figura 1. Região dorsal e ventral de <i>Carcinus maenas</i>	21
Figura 2. Representação em diagrama dos diferentes comportamentos das HNS.....	26
Figura 3. Estrutura química do acrilonitrilo e da anilina.....	28
Figura 4. Local de amostragem de caranguejo verde no estuário do rio Minho para utilização em ensaios laboratoriais.....	32
Figura 5. Sistema experimental montado para a realização dos ensaios de exposição a acrilonitrilo e anilina.....	34
Figura 6. Esquema indicativo da variação de salinidade induzida durante a exposição a acrilonitrilo e anilina.....	35
Figura 7. Órgãos internos de <i>C.maenas</i> 1- Glândula digestiva; 2- Gânglio; 3- Músculo; 4- Brânquias.....	36
Figura 8. Quantidade de alimento ingerida (média e erro padrão da média) pelos caranguejos expostos a acrilonitrilo.....	44
Figura 9. Atividade da acetilcolinesterase (média e erro padrão da média) determinada no gânglio e no músculo de caranguejos expostos a acrilonitrilo.....	45
Figura 10. Atividade da lactato desidrogenase e da isocitrato desidrogenase dependente de NADP ⁺ (média e erro padrão da média) determinadas no músculo de caranguejos expostos a acrilonitrilo.....	46
Figura 11. Atividade das glutatona S-transferase e da glutatona peroxidase (média e erro padrão da média) determinadas na glândula digestiva de caranguejos expostos a acrilonitrilo.....	47
Figura 12. Níveis de peroxidação lipídica (média e erro padrão da média) determinados na glândula digestiva de caranguejos expostos a acrilonitrilo.....	48
Figura 13. Quantidade de alimento ingerida (média e erro padrão da média) pelos caranguejos expostos a anilina.....	50
Figura 14. Atividade da acetilcolinesterase (média e erro padrão da média) determinada no gânglio e no músculo de caranguejos expostos a anilina.....	51

Figura 15. Atividade da lactato desidrogenase e da isocitrato desidrogenase dependente de NADP ⁺ (média e erro padrão da média) determinadas no músculo de caranguejos expostos a anilina.....	52
Figura 16. Atividade das glutathionas S-transferase e da glutathiona peroxidase (média e erro padrão da média) determinadas na glândula digestiva de caranguejos expostos a anilina.....	53
Figura 17. Níveis de peroxidação lipídica (média e erro padrão da média) determinados na glândula digestiva de caranguejos expostos a anilina.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1. Características físicas e químicas do acrilonitrilo e da anilina.....	29
Tabela 2. Valores dos fatores abióticos medidos na água do rio Minho no Inverno e início da Primavera de 2015.....	33
Tabela 3. Níveis de acrilonitrilo expressos em µg/L, medidos em alíquotas de água do ensaio recolhidas ao fim de 24 horas de exposição.....	41
Tabela 4. Valores (média ± desvio padrão) relativos ao ensaio de alimentação, à atividade de enzimas de neurotransmissão, de produção energética, biotransformação e de defesas antioxidativas e aos níveis de peroxidação lipídica medidos nos tecidos de caranguejos no início dos ensaios (T0).....	42
Tabela 5. Resultados da ANOVA a dois critérios efetuada para investigar os efeitos da concentração e da salinidade nos biomarcadores analisados nos tecidos de caranguejos expostos a acrilonitrilo.....	43
Tabela 6. Resultados da ANOVA a dois critérios efetuada para investigar os efeitos da concentração e da salinidade nos biomarcadores analisados nos tecidos de caranguejos expostos a anilina.....	49

Lista de abreviaturas

Ach - acetilcolina

AChE - acetilcolinesterase

ACN – acrilonitrilo

AI – modelo de ação independente

ANL - anilina

CAT - catalase

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CEO - óxido 2- cianoetileno

ChE – colinesterases

CYP- citocromo P450

DTNB – ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzeno)

DTT – ditioneitol

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutathione reduzida

GST - glutathione S-transferase

GSSG – glutathione oxidada

HNS - Hazardous and Noxious Substances (Substâncias Perigosas e Nocivas)

IDH – isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺

IMO - International Maritime Organization (Organização Marítima Internacional)

LD – limite de detecção

LDH - lactato desidrogenase

LOEC – Lowest Observed Effect Concentration

LPO – peroxidação lipídica

MDA – malondealdeído

MAC - maximum allowable concentration

MARPOL 73/78 Convention - International Convention for the Prevention of Pollution from Ships

NADH – forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADP⁺- fosfato oxidado de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH – fosfato reduzido de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NOEC - No Observable Effect Concentration

PMSF – fenilmetilsulfonilflúor

PTFE - politetrafluoroetileno

OPRC-HNS Protocol - Protocol on Preparedness, Response and Co-operation to Pollution Incidents by Hazardous and Noxious Substances

ROS - Reactive Oxygen Species (Espécies reativas de oxigénio)

SPME – microextração de fase sólida

SOD- superóxido dismutase

SOLAS Convention - Safety Of Life At Sea Convention

SRC - serious risk concentration

TBARS - substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico

UNCLOS Convention - United Nations Convention on the Law of the Sea Convention

Resumo

A salinidade é um dos fatores ambientais mais importantes a ter em conta em ecossistemas estuarinos devido à sua constante variação. Este parâmetro tem uma grande influência nos organismos aquáticos, podendo atuar como um fator de stress. No entanto, devido à constante entrada de contaminantes nestes ecossistemas, é frequente os organismos estuarinos encontrarem-se expostos a múltiplos stressores, *i.e.*, a exposição simultânea a químicos de origem humana e fatores de stress naturais. Esta exposição pode originar interações que podem causar efeitos antagonistas ou sinérgicos, influenciando o bem-estar dos animais e a avaliação de risco ambiental dos químicos de interesse. Nos últimos 30 anos tem ocorrido um crescimento notável no transporte marítimo de produtos químicos devido à elevada pressão do mercado global. Consequentemente, o risco de acidentes é cada vez maior. Os derrames de substâncias perigosas e nocivas (Hazardous and Noxious Substances- HNS) têm sido alvo de grande preocupação entre a comunidade científica devido às suas diversas e pouco conhecidas características físicas, químicas e toxicológicas, tornando complicada a sua avaliação de risco. O acrilonitrilo (ACN) é um composto produzido em grandes quantidades pelo Homem e usado em diversas indústrias para a produção de plásticos e borracha. A anilina (ANL) é um composto orgânico com diversas aplicações, como em produtos agrícolas e farmacêuticos. Estas duas substâncias possuem um comportamento diferente quando derramadas no mar devido às diferentes características físico-químicas que apresentam.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da variação da salinidade nos efeitos destas duas HNS no comportamento alimentar e em biomarcadores de alerta precoce de *Carcinus maenas*. Este é um invertebrado comum dos estuários e zonas costeiras europeias, com uma biologia bem conhecida e fácil de identificar e recolher, sendo reconhecido como um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos.

Os organismos foram expostos durante 7 dias a acrilonitrilo (0; 0,1; 1 mg/L) ou a anilina (0; 5; 50 µg/L) e no decorrer dos ensaios foi feita uma alteração repentina de salinidade para simular o efeito de um período de chuva intenso e rápido. No fim dos 7 dias de exposição foi efetuado um ensaio de alimentação e foram recolhidos tecidos para determinação de biomarcadores de neurotransmissão, metabolismo energético, biotransformação, defesas antioxidativas e de stress oxidativo.

A exposição ao acrilonitrilo causou alterações significativas em biomarcadores de neurotransmissão (atividade da enzima acetilcolinesterase, AChE), metabolismo energético (LDH), detoxificação (atividade das glutathionas S-transferase, GST) e defesas antioxidativas (atividade da glutathiona peroxidase, GPx). Adicionalmente foram detetados

efeitos da interação entre o tóxico e a variação da salinidade na atividade da AChE, determinada no gânglio e músculo, e da atividade das GST na glândula digestiva de *C. maenas*. A exposição à ANL causou alterações nos biomarcadores de neurotransmissão, metabolismo energético (atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH), e isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ (IDH), defesas antioxidativas (GPx) e dano oxidativo (peroxidação lipídica (LPO)). Contudo, efeitos da interação com a alteração de salinidade foram observados somente para a atividade das enzimas IDH e GPx.

Em geral, tanto para o acrilonitrilo como para a anilina, as interações observadas (sinergia ou antagonismo) foram diferentes para a exposição a concentrações baixas e concentrações elevadas. Estes resultados sugerem que a exposição combinada aos dois fatores causou efeitos distintos do que era expectável após uma exposição individual a cada fator. Globalmente, a salinidade teve uma maior influência na toxicidade do acrilonitrilo do que na da anilina. A influência deste fator deve ser assim tomada em consideração na avaliação de risco ambiental do acrilonitrilo.

Abstract

Salinity is one of the most important environmental factors in estuarine ecosystems due to its constant variation. This parameter has a great influence on aquatic organisms and can act as a stress factor. Since there is a constant input of contaminants in these ecosystems, organisms are often exposed to multiple stressors, *i.e.* the simultaneous exposure to man-made chemicals and natural stress factors. This exposure may lead to interactions that can cause antagonistic or synergistic effects, influencing the animal welfare and the environmental risk assessment of the chemical of interest.

Over the last 30 years there has been a remarkable growth in maritime transport of chemicals due to the high pressure of global market. Consequently, this increases the risk of accidents. Spills of hazardous and noxious substances (HNS) has been subject of great concern among scientific community. Chemicals defined as HNS present an assortment of physical, chemical and toxicological characteristics which are poorly understood, so the assessment of their ecological risk is considerably difficult. Acrylonitrile (ACN) is a man-made compound produced in large amounts and widely used in various industries such as plastics and rubber production. Aniline (ANL) is an organic compound used for various applications, such as agricultural and pharmaceutical products. These two substances have a different behavior when spilled into the sea due to their distinct physico-chemical characteristics.

The aim of this study was to evaluate the influence of salinity in the effects induced by these HNS on feeding behavior and early warning biomarkers of *Carcinus maenas*. This is a common invertebrate of European estuaries, with a well-known biology and easy to identify and collect, being widely used and recognized as an appropriate organism for ecotoxicological studies.

The organisms were exposed for 7 days to ACN (0; 0.1; 1 mg/L) or ANL (0, 5, 50 µg/L) and a sudden change was made in salinity in order to simulate the effect of a short period of intense rain. At the end of the experiments, a feeding assay was performed and crab tissues were collected for determination of neurotransmission, energy metabolism, biotransformation, anti-oxidative defenses and oxidative stress biomarkers.

Exposure to ACN caused significant changes in neurotransmission (activity of the enzyme acetylcholinesterase, AChE), energy metabolism (LDH), detoxification (activity of glutathione S-transferases, GST) and anti-oxidant defenses biomarkers (glutathione peroxidase (GPx) activity). Furthermore, effects of the interaction between compound and salinity were also detected in AChE activity, determined in the ganglion and muscle, and GST activity in the digestive gland of *C. maenas*. Exposure to ANL caused changes in neurotransmission, energy metabolism (lactate dehydrogenase enzyme activity, LDH, and

isocitrate dehydrogenase activity, IDH), anti-oxidant defense (GPx) and oxidative stress biomarkers (lipid peroxidation (LPO)). However, effects of interaction concentration x salinity were only observed for the activity of IDH and GPx.

In general, for both ACN and ANL, interactions of synergy or antagonism were different with regard to exposure to low and high concentrations. These results suggest that the combined exposure to both factors caused distinct effects from those expected for an exposure to each factor individually. Overall, the salinity had a greater influence on ACN toxicity comparing to that of ANL. The influence of salinity should therefore be taken into account when assessing the environmental risk of ACN.

Comunicações

No âmbito do trabalho desenvolvido por esta tese foi submetido e aceite para apresentação num encontro científico nacional a seguinte publicação:

Monteiro, C., Abreu, I.O., Rocha, A.C., Ferreira, M., Guimarães, L., Reis-Henriques, M.A. (2015). Does salinity influences the toxicity of acrylonitrile? Workshop ECORISK, com o tema “Monitorização e avaliação de risco ecológico de derrames químicos e contaminação ambiental por substâncias químicas: óleos, substâncias perigosas e nocivas, contaminantes clássicos e emergentes”. Porto (Portugal), 12 de junho. (apresentação de poster).

1. Introdução

1.1 Estuários

Entre os ambientes mais importantes das zonas costeiras estão os estuários, que constituem zonas de transição entre ecossistemas de água doce e de água salgada, sendo das áreas de maior produtividade biológica do planeta Terra (Kennish, 2002, Moreira *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2012). As zonas estuarinas constituem um importante *habitat* para uma grande diversidade de espécies aquáticas, servindo para diversas funções ecologicamente vitais, como a desova, berçário, alimentação e refúgio de várias espécies de peixes e invertebrados (Chapman e Wang, 2001; Amaral *et al.*, 2009). Desta forma, os estuários apresentam uma elevada densidade populacional de micróbios, plâncton, flora e fauna bentónica e nécton (Kennish, 2002). Devido aos seus recursos e valor económico, estas zonas são também locais de intensa atividade humana sendo alvo de diversas perturbações que levam a alterações no *habitat* e na estrutura e dinâmica da comunidade biótica (Kennish, 2002; Rodrigues *et al.*, 2013). De facto, os ambientes estuarinos estão classificados como um dos sistemas aquáticos mais impactados (Kennish, 2002) e, tendo em conta a sua reconhecida relevância ecológica, a qualidade e estado de conservação destes ecossistemas são atualmente considerados uma prioridade (Rodrigues e Pardal, 2014).

Estes complexos sistemas possuem características físicas e químicas únicas (Kennish, 2002), apresentando uma elevada variação na salinidade, temperatura, pH, oxigénio dissolvido, nutrientes e quantidade e composição de matéria particulada (Chapman e Wang, 2001). Estas variações são devidas quer à influência das marés quer a variações climáticas ou mesmo, em vários casos, às atividades antropogénicas que se concentram nestas áreas.

Devido à interface entre água doce e salgada, o fator ambiental que mais se destaca nos estuários é a salinidade e a sua constante variação (Chapman e Wang, 2001). Este parâmetro tem uma grande influência na distribuição e fisiologia das espécies estuarinas e pode atuar como um fator de stress natural para os organismos (Rodrigues *et al.*, 2014). Com o constante aporte de poluição que tem ocorrido nestes sistemas, os organismos estão habitualmente expostos a fatores múltiplos, *i.e.* contaminantes e outros fatores ambientais (Heugens *et al.*, 2001). Esta exposição combinada pode originar interações que causam efeitos distintos dos que seriam causados pela exposição individual a cada um desses fatores, *e.g.* efeitos antagonistas ou sinérgicos que podem influenciar a adaptação e sobrevivência dos animais aquáticos. A salinidade pode influenciar significativamente a biodisponibilidade e a toxicidade de vários poluentes

aquáticos (Chapman e Wang, 2001) e por outro lado, a exposição aos poluentes pode influenciar a tolerância dos organismos à salinidade (Rodrigues *et al.*, 2012).

A ocorrência e efeitos destas interações não são ainda conhecidos para a vasta diversidade de poluentes libertados para o meio aquático. Estudos vários indicam que os efeitos detetados nem sempre estão de acordo com os provocados pelos fatores de stress quando atuando individualmente (Heugens *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2014; Turja *et al.*, 2014), realçando a importância de simular experimentalmente cenários mais próximos àqueles a que os organismos estão expostos no ambiente natural (SCHER, 2013). Por exemplo, baixas salinidades aumentam a toxicidade dos metais, mas no que se refere aos pesticidas não existe ainda uma clara relação, com a exceção dos pesticidas organofosforados para os quais altas salinidades aumentam a sua toxicidade (Heugens *et al.*, 2001).

É importante notar também que outros estudos indicam que as alterações climáticas em curso estão a provocar importantes alterações hidrológicas a nível global com impacto na salinidade dos ecossistemas aquáticos (Hosoda *et al.*, 2009; IPCC, 2014). O aumento da magnitude da precipitação e da intensidade de ondas de calor levam a alterações do nível do mar provocando mudanças repentinas de salinidade, afetando os organismos estuarinos (Levinton *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2014). Em particular, a salinidade estuarina varia com o fluxo da água, pelo que alterações na intensidade e frequência de precipitação, derivadas das alterações climáticas, podem provocar diminuição e variação forte de salinidade. Desta forma, torna-se relevante compreender o efeito combinado deste potencial de variação e da toxicidade de compostos considerados perigosos e nocivos em organismos com papel ecológico chave em ecossistemas estuarinos e costeiros.

1.2 *Carcinus maenas*

O caranguejo verde, *Carcinus maenas*, é um invertebrado epibêntico pertencente à família Portunidae e comum nas costas e estuários europeus (Klassen e Locke, 2007). No entanto, atualmente, encontra-se também distribuído por outras regiões, como África do Sul, Japão, Austrália, Estados Unidos e Canadá, nas quais é considerado uma espécie invasora (Klassen e Locke, 2007; Rodrigues *et al.*, 2012).

C. maenas é um dos organismos estuarinos mais bem estudados, com uma biologia bem conhecida, e é considerada uma espécie ecologicamente relevante que ocupa uma posição chave na teia alimentar (Amaral *et al.*, 2009; Mesquita *et al.*, 2011; Rodrigues e Pardal, 2014). *C. maenas* é um caranguejo de tamanho médio, omnívoro, que vive entre 4 a 7 anos, e cujo ciclo de vida alterna entre estádios de larva planctónica e adulto bentónico (Klassen e Locke, 2007).

Os machos e fêmeas são facilmente distinguidos através de algumas características morfológicas como o formato do abdômen: nos machos é triangular, com 5 segmentos (Figura 1), e nas fêmeas é amplo e arredondado, com 7 segmentos (Crothers, 1967; Rodrigues e Pardal, 2014). Apesar do seu nome comum, o caranguejo verde pode ter dois morfótipos de cor observada no seu abdômen, nomeadamente vermelho (de laranja claro a vermelho escuro) e verde. A coloração mais avermelhada está associada a períodos de intermuda prolongados e pensa-se que se trata de uma estratégia reprodutiva (Rodrigues e Pardal, 2014 e referências citadas). No entanto, estudos indicam que os caranguejos de coloração verde parecem ser mais tolerantes e resistentes ao stress ambiental a que poderão estar sujeitos como, por exemplo, baixos níveis de oxigénio (Rodrigues e Pardal, 2014 e referências citadas).



Figura 1. Região dorsal e ventral de *C. maenas* macho.

Os caranguejos possuem um esqueleto rígido que lhes fornece suporte e proteção. Uma vez que este esqueleto não tem a capacidade de mudar de forma, o caranguejo tem de o abandonar para crescer num processo denominado por muda (Crothers, 1967; Rodrigues e Pardal, 2014). Após a perda do esqueleto antigo, o caranguejo apresenta uma cutícula fina que, com o tempo, vai endurecendo (Mesquita *et al.*, 2011). Durante este período, os organismos enterram-se no sedimento pois ficam frágeis, indefesos, incapazes de se alimentar e dificilmente se movem (Crothers, 1967).

Tendo em conta o conhecimento disponível sobre a biologia desta espécie e o facto de ser um organismo fácil de manter em laboratório e de ser sensível à contaminação, este crustáceo é regularmente usado como organismo modelo em diversos estudos (Pereira *et al.*, 2006; Jillette *et al.*, 2011; Mesquita *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2012; Rodrigues e Pardal, 2014; Rodrigues *et al.*, 2015) para avaliação de efeitos tóxicos adversos induzidos por compostos químicos. *C. maenas* é reconhecido como um organismo teste adequado à realização de ensaios de toxicidade, em particular no que diz respeito ao uso de biomarcadores de exposição e efeito (Rodrigues e Pardal,

2014). Esta avaliação pode ser feita com recurso a parâmetros fisiológicos, comportamentais, bioquímicos e moleculares (Mesquita *et al.*, 2011). Adicionalmente estes crustáceos têm sido usados como organismos teste para investigar interações toxicidade-salinidade (Heugens *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2014).

1.3 Biomarcadores de alerta precoce

A ecotoxicologia é um ramo da toxicologia cujo principal objetivo é estudar e avaliar os efeitos induzidos a curto, médio e/ou longo prazo por contaminantes nos ecossistemas, e nas suas comunidades, populações e organismos (Boudou e Ribeyre, 1997). No campo da ecotoxicologia aquática é extremamente importante existir uma complementaridade entre estudos de campo de biomonitorização e ensaios em laboratório de forma a aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de toxicidade envolvidos e melhorar a avaliação dos potenciais efeitos gerados pela exposição no ambiente natural (Boudou e Ribeyre, 1997). Ao longo dos anos foram desenvolvidas várias abordagens para detetar e quantificar os efeitos de contaminantes, abrangendo os diferentes níveis de organização biológica (molecular ao ecossistema). Estas abordagens aplicadas em ecotoxicologia incluem os testes de toxicidade e a utilização de biomarcadores de exposição e de efeito (Klaassen, 2008).

Uma boa avaliação de risco ecológico de um determinado contaminante abrange a avaliação dos seus potenciais efeitos biológicos (Cajaraville *et al.*, 2000). Estes efeitos podem ser avaliados através de parâmetros a diferentes níveis de organização biológica (e.g. sub-individual, individual, população, comunidade ou ecossistema) (Boudou e Ribeyre, 1997). Numa perspetiva de diagnóstico precoce da contaminação ambiental que permita a elaboração atempada de medidas de proteção e recuperação dos ecossistemas afetados, a avaliação de parâmetros a níveis mais elevados de organização com impacto direto na manutenção das populações e integridade das comunidades e ecossistemas é bastante informativa mas menos sensível do que a medição a níveis de organização mais baixos, *i.e.* moleculares, bioquímicos ou individuais. Os biomarcadores ambientais de alerta precoce são respostas biológicas que fornecem informação não só sobre a exposição e/ou os efeitos provocados por um determinado poluente ou um grupo de poluentes mas também sobre o seu modo de ação (Rodrigues e Pardal, 2014). Estes constituem importantes ferramentas de diagnóstico e prognóstico que poderão indicar se o organismo foi exposto a contaminação e/ou a magnitude da resposta do organismo ou da sua recuperação (Cajaraville *et al.*, 2000; Costa e Guilhermino, 2015).

Os biomarcadores ambientais têm sido amplamente propostos como abordagem útil à detecção precoce dos efeitos nefastos da contaminação nos organismos antes da manifestação de outros com repercussões ecológicas mais graves (van der Oost *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2013). Esta ferramenta é relativamente fácil e rápida de usar e é considerada uma abordagem eficaz para identificar os efeitos tóxicos de compostos nos organismos, tendo sido considerada um importante contributo em estudos de ecotoxicologia (Galloway *et al.*, 2004; Rodrigues e Pardal, 2014) a incorporar nos descritores de efeitos biológicos recomendados para monitorização no âmbito da Directiva Quadro da Água e da Directiva Quadro Estratégia Marinha (Martínez-Gómez *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas alterações da atividade de diversas enzimas têm vindo a ser usadas como biomarcadores ambientais (Rodrigues e Pardal, 2014; Costa e Guilhermino, 2015). Entre elas, alterações de biomarcadores envolvidos em funções fisiológicas essenciais à sobrevivência e bem-estar do organismo relacionados com a neurotransmissão, produção de energia, detoxificação, defesas antioxidativas e de stress oxidativo. As colinesterases (ChE), por exemplo, são uma importante família de enzimas, na qual se inclui a acetilcolinesterase (AChE) que está envolvida na transmissão colinérgica (van der Oost *et al.*, 2003), degradando o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas e hidrolisando a ACh em colina e ácido acético. Esta família de enzimas encontra-se presente tanto em vertebrados como em invertebrados e a inibição da sua atividade tem sido usada como um critério de efeito em estudos ecotoxicológicos com *C. maenas* (Mesquita *et al.*, 2011; Rodrigues e Pardal, 2014).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citoplasmática envolvida na via anaeróbica de produção de energia, que catalisa a conversão do piruvato a lactato na glicólise. A sua atividade tem vindo a ser usada como indicativo de potenciais efeitos de compostos tóxicos com consequências na produção de energia (Mesquita, *et al.*, 2011). A isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (IDH) também se encontra envolvida na produção de energia, mas pela via aeróbica, tendo um papel importante na regeneração de fosfato reduzido de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e estando diretamente relacionada com a manutenção do balanço redox celular (Lima *et al.*, 2007; Mesquita, 2010).

As glutatona S-transferase (GST) são uma família de enzimas envolvidas na detoxificação de substâncias endógenas e de xenobióticos. Conjugam os compostos eletrofílicos com a glutatona reduzida (GSH), oxidando-a (glutatona oxidada, GSSG) (van der Oost *et al.*, 2003; Mesquita, 2010). Têm ainda um papel importante na proteção dos tecidos contra o stress oxidativo. A glutatona peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante que catalisa a conversão do peróxido de hidrogénio (H₂O₂), proveniente do

metabolismo celular, em água e oxigênio (Mesquita, 2010). Quando ocorre um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species- ROS) geradas durante a detoxificação (e.g., H_2O_2) e as defesas antioxidativas do organismo, as ROS produzidas podem causar danos oxidativos nas macromoléculas celulares. A avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) dá indicação sobre o dano oxidativo de lípidos membranares, sendo por isso bastante utilizada (van der Oost *et al.*, 2003; Mesquita, 2010).

Parâmetros comportamentais (e.g., alimentação, locomoção) têm também mostrado potencial para a avaliação precoce de efeitos de contaminantes em *C. maenas* (Mesquita, 2010; Rodrigues e Pardal, 2014). Estes têm a vantagem de permitir ligar as alterações bioquímicas observadas a níveis mais elevados de organização com reflexo na população, necessitando por isso de mais investigação sobre a sua sensibilidade a concentrações ambientalmente relevantes (Rodrigues e Pardal, 2014).

1.4. Substâncias perigosas e nocivas (HNS)

O meio aquático, e em especial os estuários, têm sido alvo de grande atenção e preocupação devido à sua contínua contaminação e, conseqüente, diminuição da qualidade da água. Anualmente, toneladas de compostos sintéticos usados na indústria, na agricultura e de uso humano têm como destino final os sistemas aquáticos (Cajarville *et al.*, 2000; Schwarzenbach *et al.*, 2006). A título de exemplo, na União Europeia, existem mais de 100 000 substâncias químicas registadas, das quais entre 30 000 a 70 000 são de uso diário (Schwarzenbach *et al.*, 2006). Esta diminuição da qualidade da água tem como resultado efeitos adversos nos ecossistemas, nos recursos biológicos e conseqüentemente na saúde ambiental e humana (Monserat *et al.*, 2004). Desta forma, torna-se importante compreender os efeitos nefastos provocados pelas substâncias químicas libertadas para o meio aquático para que se possa desenvolver planos de mitigação e regulamentação visando a proteção destes ecossistemas.

Nos últimos 30 anos tem ocorrido um crescimento notável no transporte marítimo de produtos químicos (Mamaca *et al.*, 2009), tendo mais que triplicado o volume transportado (CEDRE, 2012). Este contínuo desenvolvimento do transporte por mar é determinado pela elevada pressão do mercado global, o qual conseqüentemente torna cada vez maior o risco de acidentes. Por esta razão tem havido uma maior preocupação das entidades governamentais e científicas em avaliar o risco ecológico associado a derrames de substâncias químicas. A ameaça de derrames de petróleo e as suas conseqüências para o meio aquático têm sido intensamente estudadas, existindo atualmente diversos documentos reguladores relativamente ao seu transporte e de mitigação dos efeitos de derrames (CEDRE, 2012). Os derrames de petróleo têm sido

alvo de maior atenção, uma vez que têm um grande impacto visual e consequências imediatas nos organismos e ecossistemas, mas também nas atividades económicas (Rocha *et al. submetido*). No entanto, ocorrem também derrames de outras substâncias perigosas que dependendo das suas propriedades químicas podem causar efeitos nefastos nos organismos aquáticos. De acordo com a Organização Marítima Internacional (IMO- International Maritime Organization), estas foram coletivamente designadas por Substâncias Perigosas e Nocivas (HNS – Hazardous and Noxious Substances) sendo definidas como qualquer substância transportada por via marítima, excetuando o petróleo, que se for introduzida no meio marinho é suscetível de criar riscos para a saúde humana, prejudicar os recursos vivos, danificar instalações e/ou interferir com outras utilizações legítimas do mar (IMO, 2000). A IMO, criada em 1948, é um órgão que define as regras relativas à segurança marítima a nível global. Tem como objetivos estabelecer colaborações entre Estados-membro nos regulamentos, definir e adotar normas de segurança no transporte e prevenir a poluição ambiental causada por navios (CEDRE, 2012). O protocolo OPRC-HNS, sobre preparação, resposta e cooperação em incidentes com HNS adotado pela IMO (2000), entrou em vigor em 2007 e em 2011 foi ratificado por 25 países (Neuparth *et al.*, 2011).

De facto, a ocorrência de derrames de HNS tem sido cada vez mais frequente. Neuparth *et al.* (2011) publicaram uma lista dos acidentes ocorridos entre 1987 e 2011 na costa europeia. O CIIMAR elaborou também a primeira base de dados exclusivamente dedicada a derrames acidentais de HNS no ambiente marinho (Cunha *et al.*, 2015). Por exemplo, em 1988, na Holanda, o navio Anna Broere colidiu com outro navio e derramou 547 toneladas de acrilonitrilo; e, em 1991, o navio Alessandro Primo, contendo 594 barris de acrilonitrilo, foi destruído numa tempestade na costa italiana (Mamaca *et al.*, 2009, Cunha *et al.*, 2015). Os derrames acidentais de HNS podem ocorrer por diversas razões, nomeadamente, falhas estruturais no navio, condições meteorológicas adversas, manobras inadequadas, incidentes durante as operações de carga/descarga nos portos ou problemas com a carga transportada (Mamaca *et al.*, 2009; CEDRE, 2012).

Este aumento do transporte de HNS e da ocorrência de derrames acidentais levam a uma crescente consciência internacional para a necessidade de desenvolver planos de contingência como resposta a possíveis derrames e melhorar a segurança marítima (ITOPF, 2011). O transporte de HNS por navio encontra-se na atualidade dirigido por vários regulamentos internacionais para prevenir e identificar os riscos da poluição deste tipo de poluentes. Estes regulamentos baseiam-se em três principais convenções internacionais:

- 1) a convenção UNCLOS (United Nations Convention on the Law of the Sea), que entrou em vigor a 1994 e estabelece os princípios orientadores do direito

internacional sobre os limites que definem zonas marítimas e as principais regras aplicáveis nos oceanos a nível global;

- 2) a convenção SOLAS (Safety of Life at Sea), que entrou em vigor em 1980 e tem como objetivo evitar acidentes e garantir a segurança de vidas humanas no mar;
- 3) a convenção MARPOL 73/78 (International Convention for the Prevention of Pollution from Ships), entrou em vigor em 1983 e centra-se na prevenção da poluição provocada por navios (CEDRE, 2012).

O grupo das HNS engloba um leque vasto de substâncias que apresentam propriedades físicas, químicas e toxicológicas muito diversificadas e ainda pouco conhecidas (ITOPF, 2011; Cunha *et al.*, 2014). Esta diversidade dificulta a avaliação de risco de HNS dado que, quando libertadas para o meio aquático, estas substâncias apresentarão comportamentos muito distintos, ao contrário por exemplo do petróleo que flutua na superfície e é imiscível com a água (CEFAS, 2009; Neuparth *et al.*, 2010). O modo de dispersão das HNS pode ser dividido em cinco tipos (Figura 2): podem gaseificar (G), flutuar (F), afundar (A), evaporar (E) e dissolver (D), podendo assim causar toxicidade a uma grande variedade de organismos (Neuparth *et al.*, 2010).

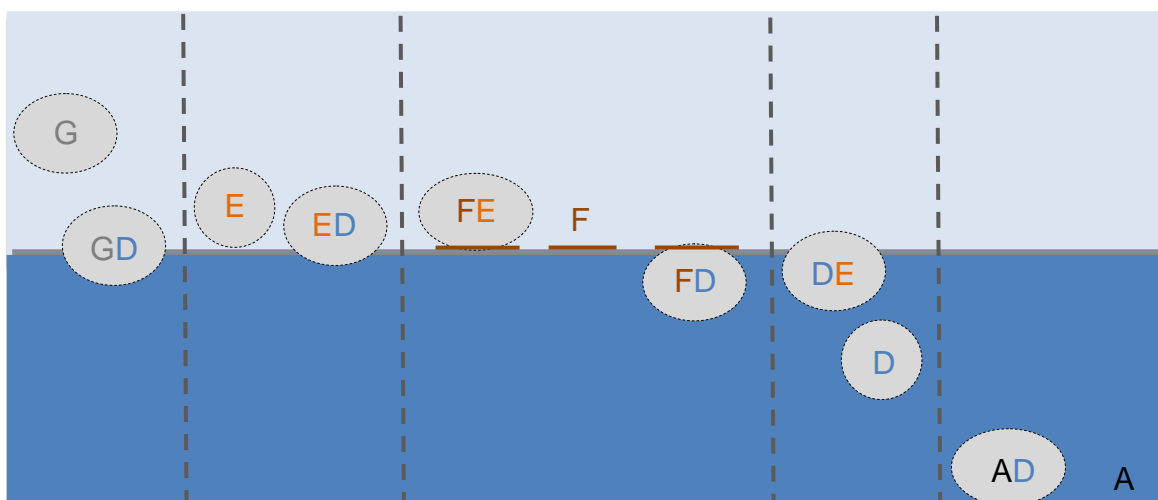


Figura 2. Representação em diagrama dos diferentes comportamentos dos HNS (adaptado de ITOPF, 2011): gaseificação (G), flutuação (F), afundamento (A), evaporação (E) e dissolução (D).

Os efeitos provocados pelas HNS no ambiente aquático dependem de uma série de fatores como a toxicidade do composto em questão, as quantidades envolvidas e as concentrações resultantes, o tempo de exposição e a própria sensibilidade dos organismos (ITOPF, 2010). A ameaça inerente dos derrames de HNS e as consequências produzidas não são tão conhecidas como para os derrames de petróleo (Kirby e Law, 2010; Neuparth *et al.*, 2010; Neuparth *et al.*, 2011), facto que aliado à grande variedade de substâncias pertencentes a este grupo dificulta a elaboração de

protocolos de contingência e o estabelecimento de compensações por danos ambientais causados pelos derrames ocorridos (Rocha *et al. submetido*). No entanto, sabe-se que muitas destas substâncias induzem efeitos nefastos em diversos organismos aquáticos (Neuparth *et al.*, 2013; Neuparth *et al.*, 2014; Rocha *et al. submetido*). No contexto do projecto ARCOPOL foi elaborada uma lista das 23 substâncias perigosas e nocivas prioritárias, na qual se encontram por exemplo o benzeno, xileno, tolueno, anilina, acrilonitrilo e o tricloroetileno (Neuparth *et al.*, 2011). Para a elaboração desta lista foi utilizado um conjunto de critérios, que englobaram, a frequência e os volumes de HNS transportados, os acidentes reportados nas águas Europeias, as propriedades físicas e químicas das HNS e a sua toxicidade para organismos aquáticos (Neuparth *et al.*, 2011). Verificou-se efetivamente que existe não só falta de conhecimento sobre os efeitos nefastos destas substâncias nos organismos aquáticos, mas também que a maioria dos estudos ecotoxicológicos existentes foram realizados com organismos de água doce (Neuparth *et al.*, 2010; Rocha *et al. submetido*). O acrilonitrilo (ACN) e a anilina (ANL) são exemplos de dois destes compostos para os quais há escassez de conhecimento sobre os seus efeitos ecotoxicológicos em organismos marinhos e estuarinos e sobre os seus modos de ação.

1.4.1. Acrilonitrilo

O ACN (CAS No 107-13-11, Figura 3) também conhecido por cianeto de vinilo é um composto químico produzido em grandes quantidades pelo Homem (IARC, 1999; Cole *et al.*, 2008). O ACN é um líquido incolor, à temperatura ambiente, mas é bastante volátil (Pressão de vapor: 11 kPa e constante de Henry: 11 Pa.m³/mol) e inflamável, apresentando um odor acentuado semelhante a cebola ou alho (WHO, 2002). Tendo em conta as suas características físico-químicas (Tabela 1), o ACN, quando derramado no mar, tem tendência para se evaporar e dissolver na água (Neuparth *et al.*, 2011).

O ACN é um monómero bastante usado em diversas indústrias, como plásticos, plastificantes, borracha, fibras acrílicas e resinas (Hamada *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2008; IARC, 1999). Também pode ser encontrado no fumo de escape dos carros e dos cigarros (Hamada *et al.*, 1998). Este composto tem sido produzido desde 1940 (Cole *et al.*, 2008) e anualmente a sua produção global encontra-se acima de 8,8 bilhões de toneladas (Campian *et al.*, 2002). O ACN é libertado para o ambiente como consequência da sua produção ou processamento, e também possivelmente devido à queima de plásticos e descargas de resíduos industriais (EURAR, 2004a; IARC, 1999). Adicionalmente, o ACN pode ser libertado para o meio marinho em caso de derrame, como já aconteceu anteriormente com os navios Anna Broere em 1988 e Alessandro Primo, em 1991 (Neuparth *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2015).

Com base em estudos envolvendo animais em laboratório, o ACN é rapidamente absorvido e distribuídos pelos tecidos (CEPA, 2000). No entanto, o seu potencial para acumulação é pequeno, levando a que maior parte do composto metabolizado seja excretado na urina nas primeiras 24- 48h (CEPA, 2000; WHO, 2002). O ACN é altamente tóxico, no entanto apesar dos estudos efetuados, o seu mecanismo de toxicidade ainda não está bem estabelecido (Campian *et al.*, 2002; Carrera *et al.*, 2007). O ACN é metabolizado principalmente por duas vias: a conjugação com a glutatona, formando N-acetil-S-(2-cianoetil) cisteína, e por oxidação pelo citocromo P450 que leva à formação de óxido 2- cianoetilenos (CEO) (Kedderis e Batra, 1993; CEPA, 2000). O CEO é posteriormente biotransformado em cianeto (Campian *et al.*, 2002; Carrera *et al.*, 2007). Dados sugerem que a toxicidade do ACN está associada ao composto inicial mas também aos seus metabolitos, *e.g.* CEO e o cianeto (Campian *et al.*, 2002; Campian e Benz, 2008). Estudos revelaram que o CEO é mutagénico e é responsável por atividade carcinogénica em ratos (Kedderis e Batra, 1993; EURAR, 2004a) e o cianeto, um neurotóxico, pode induzir danos tóxicos severos nos organismos, sendo dez vezes mais potente que o composto parental (Campian *et al.*, 2002; Carrera *et al.*, 2007). Adicionalmente, o ACN pode induzir stress oxidativo nos indivíduos expostos promovendo um aumento na produção de ROS (Watcharasit *et al.*, 2010) e levando a uma consequente redução nas moléculas antioxidantes celulares em vários tecidos, incluindo a GSH (IARC, 1999; Campian *et al.*, 2002; Carrera *et al.*, 2007; Watcharasit *et al.*, 2010). A sua toxicidade aguda é relativamente elevada (WHO, 2002), podendo originar irritação aguda dos tecidos moles, sangramento gástrico, imunotoxicidade e neurotoxicidade em animais (*e.g.* ratos) (Hamada *et al.*, 1998; Watcharasit *et al.*, 2010).

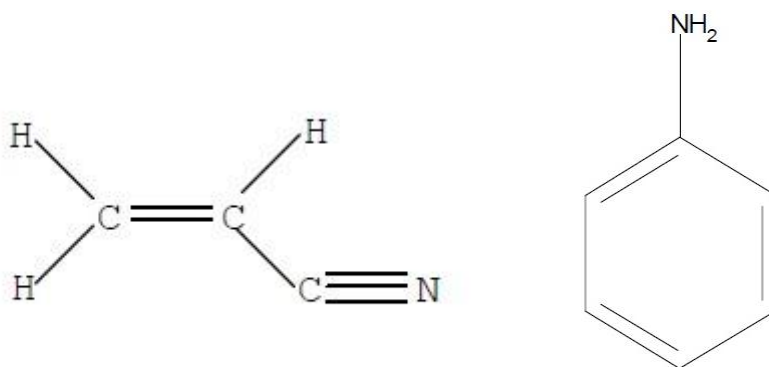


Figura 3. Estrutura química do acrilonitrilo (esquerda) e da anilina (direita) (WHO, 2002; EURAR, 2004b)

Tabela 1. Características físicas e químicas do acrilonitrilo e da anilina (WHO, 2002; EURAR, 2004a; EURAR, 2004b; Kahl *et al.*, 2005).

Propriedades	Acrilonitrilo	Anilina
Solubilidade em água (g/L)	75.1 (25°C)	35 (20 °C)
Solubilidade	Solúvel na maioria dos solventes orgânicos	Miscível na maioria dos solventes orgânicos
Densidade (20 °C) (g/L)	806	1022
Ponto de ebulição (°C)	77.3	184.4
Pressão de vapor (kPa)	11 (25 °C)	0.04 (20 °C)
Constante da lei de Henry (25°C) (Pa.m ³ /mol)	11	0.106
Log coeficiente partição carbono orgânico/água (log K _{oc})	1.06	1.41
Log coeficiente partição octanol/água (log K _{ow})	0.25	0.91
Log fator bioconcentração em peixes (log BCF)	0.48-1.68	2.6
Semi-vida (t 1/2)		
Água (h)	170	360
Sedimento (h)	550	-

1.4.2. Anilina

A ANL (CAS No 62-53-3, Figura 3), também conhecida por fenilamina ou aminobenzeno (CEPA, 1994; de los Santos *et al.*, 2015), é um composto orgânico que à temperatura ambiente se encontra no estado líquido com um aspeto gorduroso, incolor e com um odor característico (Tabela 1) (EURAR, 2004b). A ANL é a molécula parental da família das aminas aromáticas e foi isolada pela primeira vez no início do século XIX (Kahl *et al.*, 2005). Este composto é utilizado como intermediário para várias aplicações como, por exemplo produtos químicos de processamento de borracha, corantes e pigmentos, produtos químicos agrícolas e produtos farmacêuticos (Kahl *et al.*, 2005).

Devido às suas características físico-químicas (Tabela 1), a ANL tem tendência para se dissolver na água (de los Santos *et al.*, 2015). A ANL pode ser libertada para o ambiente através da sua produção, processamento, e do seu uso (EURAR, 2004b). Tal como o ACN, a libertação de ANL para o meio aquático também se verificou no passado

por derrame devido a acidentes navais (Cunha *et al.*, 2015) ou em indústrias, como aconteceu recentemente, em 2012, numa fábrica na China na qual foram derramadas mais de 38 toneladas de ANL para um rio (NYTIMES, 2013).

A ANL é rapidamente absorvida pelo organismo após ingestão oral, inalação e contacto dérmico (Kahl *et al.*, 2005). A ANL é metabolizada, principalmente no fígado ou glândula digestiva (Kahl *et al.*, 2005). O metabolismo deste composto ocorre por três vias metabólicas: N-acetilação, hidroxilação aromática e N-hidroxilação (CEPA, 1994). Na primeira, a ANL transforma-se em acetanilida, pela N-acetiltransferase hepática, enquanto que, na hidroxilação aromática e na N-hidroxilação, o metabolismo ocorre por meio do sistema citocromo P450, sendo a ANL metabolizada em aminofenol e em N-fenilhidroxilamina, respetivamente (CEPA, 1994; EURAR, 2004b). Admite-se que a via da N-acetilação será uma via importante pela qual a ANL é detoxificada, no entanto a N-hidroxilação parece ser a via principal pela qual a ANL produz efeitos tóxicos (CEPA, 1994).

1.5 Objetivos

É importante que haja uma cooperação entre as entidades científicas e governamentais de forma a melhorar a segurança marítima. Para tal, a existência de estudos de avaliação de risco ambiental e o desenvolvimento de metodologias padrão são essenciais para a elaboração dos planos de resposta com o objetivo de minimizar os riscos para os ecossistemas e saúde humana e mitigar perdas económicas. Uma resposta totalmente integrada e eficaz após um derrame de HNS no mar deve incluir uma avaliação bem planeada e executada da contaminação ambiental e dos danos provocados (Kirby e Law, 2010).

O objetivo principal deste estudo centrou-se na avaliação da variação rápida e intensa de salinidade, nos efeitos de duas HNS no comportamento alimentar e em biomarcadores de alerta precoce de caranguejo verde, *Carcinus maenas*. A informação disponível sobre a interação da salinidade com compostos tóxicos é ainda escassa, sobretudo para os efeitos de variações intensas que ocorrem em curtos espaços de tempo como se tem verificado no atual contexto de instabilidade climática. Adicionalmente, os efeitos induzidos pelas duas HNS selecionadas, acrilonitrilo e anilina, assim como os seus modos de ação, são ainda pouco compreendidos, tendo a maior parte dos estudos sido realizados com organismos de água doce e mamíferos. Tendo em conta o aumento no transporte destas substâncias por via marítima e da possibilidade da ocorrência de derrames com consequências também para o meio estuarino, torna-se importante compreender os seus potenciais perigos ecológicos e avaliar o seu impacto sobre organismos estuarinos e costeiros.

Desta forma e com o sentido de contribuir para o aumento do conhecimento sobre o risco ambiental de HNS e potencial influência da variação de salinidade nos seus efeitos, neste trabalho foram colocadas à partida várias questões de investigação: 1) Será que a alteração de salinidade influencia os efeitos dos compostos testados, alterando significativamente o comportamento de alimentação e os biomarcadores avaliados?; 2) Serão as possíveis interações observadas sinérgicas ou antagonistas? e 3) Será a exposição combinada aos dois fatores capaz de causar efeitos potencialmente graves a níveis de concentrações considerados ambientalmente importantes?

Assim, no presente trabalho realizaram-se ensaios laboratoriais com *C. maenas* baseados em biomarcadores ambientais. Além dos aspetos anteriormente mencionados, o uso do caranguejo verde é visto ainda como uma vantagem ética quando comparado com a utilização de peixes em estudos ecotoxicológicos (Rodrigues e Pardal, 2014). Durante os ensaios realizados procedeu-se à avaliação do comportamento alimentar dos caranguejos expostos a diferentes condições. No final dos ensaios, de sete dias de duração, avaliaram-se vários biomarcadores potencialmente ligados ao metabolismo e modo de ação das HNS testadas. Os biomarcadores selecionados foram a atividade da AChE, determinada no gânglio e no músculo. Neste último tecido também se avaliaram as atividades das enzimas LDH e IDH. Na glândula digestiva foram determinadas as atividades das GST e GPx, bem como os níveis de LPO.

2. Material e Métodos

2.1 Local de estudo e colheita dos organismos teste

Os organismos teste foram recolhidos no estuário do rio Minho na área de Caminha. Este é um estuário internacional localizado no Noroeste da Península Ibérica (Figura 4). O rio Minho tem uma extensão de cerca 300 km, definindo a fronteira entre Portugal e Espanha, e está identificado pela rede Natura 2000 como um local de interesse da União Europeia, comprovando assim a sua importância ecológica (Rodrigues *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013). O estuário do rio Minho apresenta um regime mesotidal (Ferreira *et al.*, 2003) e é pouco impactado tanto em termos de pressão antropogénica como de contaminação química (Ferreira *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2012; Capela *et al.*, 2016).

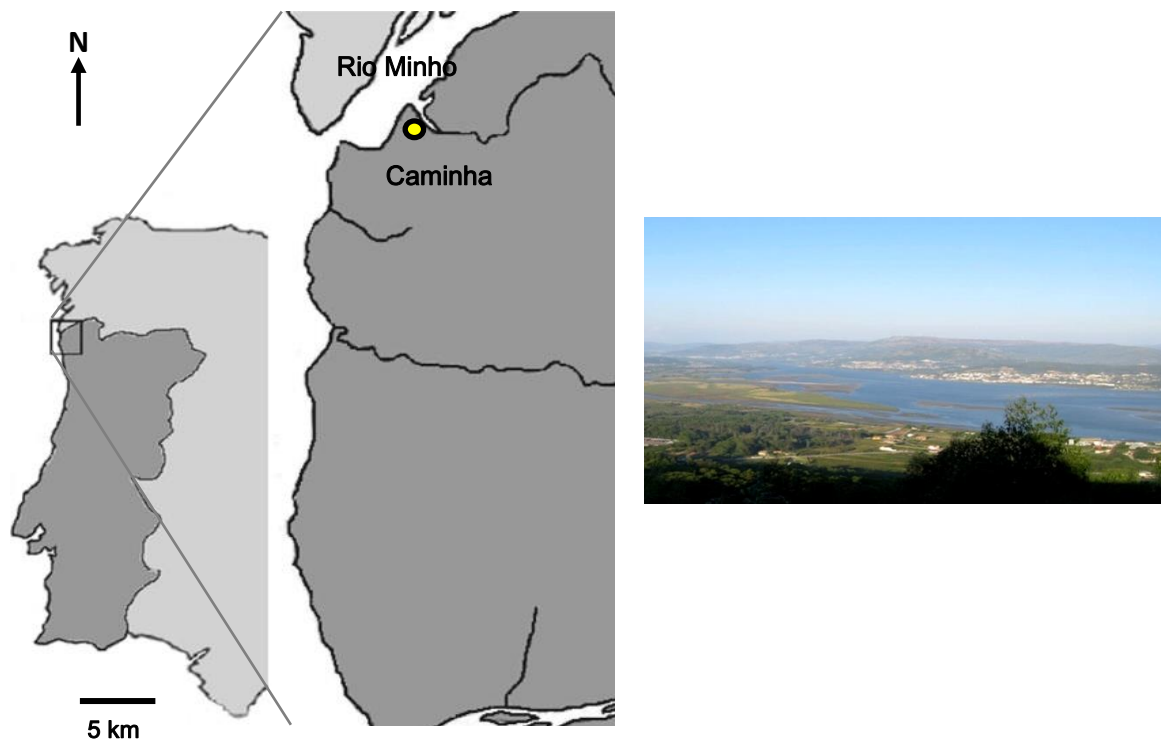


Figura 4. Local de amostragem de caranguejo verde no estuário do Rio Minho (ponto amarelo) para utilização em ensaios laboratoriais.

As amostragens foram conduzidas no inverno e no início da primavera do ano corrente. Espécimes de caranguejos foram recolhidos no período de tempo entre maré baixa e maré alta, usando redes de mão com isco, com o auxílio de um camaroeiro. Os organismos foram posteriormente colocados em caixas de isolamento térmico ($n \approx 350$). De forma a reduzir a variabilidade da amostra e evitar a interferência das alterações hormonais características do processo de muda com os parâmetros avaliados (Mesquita,

2010), apenas machos em fase de intermuda, de tamanho semelhante e com todos os apêndices completos, foram recolhidos.

No momento de amostragem efetuou-se o registo de vários parâmetros físico-químicos da água (temperatura, pH, oxigénio dissolvido e salinidade, Tabela 3), usando um medidor multiparamétrico (WTW multi 340i) com as sondas adequadas (pH Sen Tix 41 and Tetracon 325).

Tabela 2. Valores dos fatores abióticos medidos na água do rio Minho no inverno e início da primavera de 2015.

	Temperatura (°C)	pH	Salinidade (psu)	Oxigénio dissolvido (mg/L)
Inverno	11,6	7,33	29	12,15
Primavera	15,5	7,57	13	10,69

Após a recolha, os caranguejos foram transportados imediatamente para o laboratório, em caixas de isolamento térmico devidamente refrigeradas. Para a aclimação, os organismos foram colocados durante 25 a 30 dias num tanque de 300 L na obscuridade, com aerificação contínua e salinidade de 15 psu, sendo alimentados duas vezes por semana com cubos de pota congelada ($\pm 1\text{g/organismo}$), com posterior renovação do meio.

Após o período de aclimação, 72 caranguejos foram distribuídos por 18 aquários de vidro (4 organismos em cada um), com 4 L de água de salinidade 15 psu (água salgada filtrada em carvão ativado e fibra de vidro) e aerificação contínua, nos quais permaneceram cinco dias para se aclimatarem às condições do ensaio a realizar (Figura 5). A temperatura da sala foi mantida a 16°C. Os parâmetros temperatura, oxigénio dissolvido e salinidade foram medidos regularmente ao longo deste período de aclimação. Todos os caranguejos foram pesados (g) e medidos (comprimento e largura da carapaça, mm) antes do ensaio. As amostragens e os ensaios descritos foram realizados de acordo com as diretrizes da Diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e Conselho de 22 de setembro, para a proteção dos animais utilizados para fins científicos.

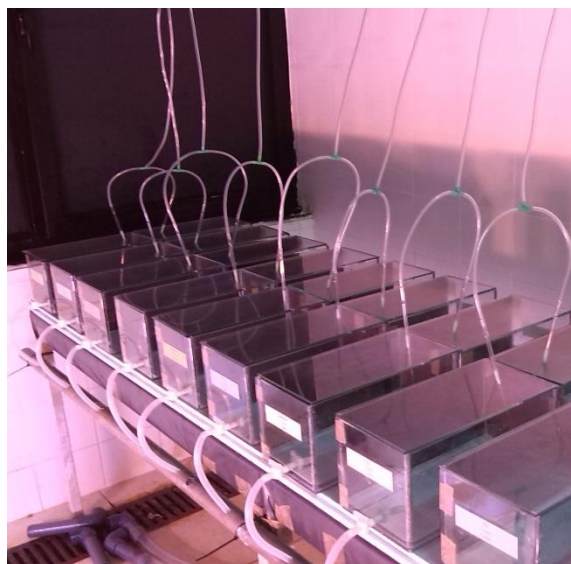


Figura 5. Sistema experimental montado para a realização dos ensaios de exposição de caranguejo *Carcinus maenas* a acrilonitrilo e anilina.

2.2 Ensaios de exposição a acrilonitrilo e anilina

Os caranguejos foram expostos em ensaios de 7 dias de duração a três tratamentos diferentes: um controlo e uma concentração baixa e outra elevada das substâncias testadas. Para o ACN utilizaram-se as concentrações: 0,1 (C1) e 1 mg/L (C2). Para a ANL as concentrações de exposição selecionadas foram de 5 (C1) e 50 (C2) µg/L. Os ensaios decorreram num regime semi-estático com renovação diária do meio experimental. Estas concentrações foram obtidas pela diluição de soluções concentradas em água salobra (15 psu, controlo) ou de salinidade baixa (5 psu) nos respetivos aquários (ver abaixo). As soluções concentradas de cada substância teste foram preparadas em água ultra-pura de dois em dois dias e armazenadas no frigorífico. As concentrações de ACN e de ANL foram selecionadas com base em valores de referência calculados a partir de dados ecotoxicológicos anteriormente publicados (EURAR 2004a, 2004b; van Vlaardingen *et al.*, 2007; van Herwijnen, 2009), simulando concentrações encontradas próximo ao momento de um possível derrame e concentrações mais baixas com importância ambiental no contexto dos valores que têm sido detetados e estimados como permissíveis. No caso do ACN, a concentração mais elevada (C2) aproxima-se à concentração de risco estabelecida para os ecossistemas aquáticos (*Serious Risk Concentration*, SRC) de 1,3 mg/L e a concentração mais baixa (C1) foi dez vezes inferior. Para a ANL onde a concentração máxima admissível (*Maximum Allowable Concentration*, MAC) é de 1 µg/L, a concentração teste mais baixa (C1) foi cinco vezes maior e a mais alta dez vezes superior à concentração mais baixa utilizada.

Para avaliar a influência da variação intensa de salinidade na toxicidade destas HNS, provocou-se uma diminuição forte de salinidade de 15 para 10 e 5 psu do 3º ao 5º dia dos ensaios, simulando o efeito de um período de chuva intenso e rápido neste parâmetro (Figura 6). A diminuição foi obtida através da diluição com água desclorada filtrada.

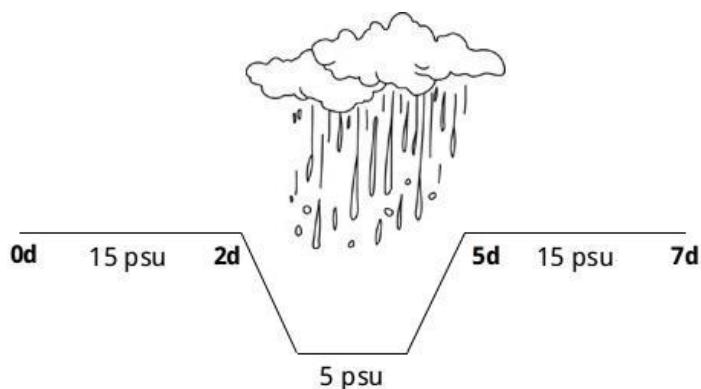


Figura 6. Esquema indicativo da variação de salinidade induzida durante a exposição a acrilonitrilo ou anilina.

Para ambas as HNS, realizaram-se dois conjuntos de tratamentos que diferiram apenas na salinidade do meio:

1. num conjunto manteve-se a salinidade a 15 psu durante os 7 dias;
2. no outro conjunto variou-se a salinidade conforme descrito.

Todos os tratamentos foram realizados em triplicado tendo sido distribuídos aleatoriamente na sala de suporte dos ensaios. Os parâmetros temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade foram medidos regularmente ao longo dos 7 dias de exposição. Para avaliar a estabilidade do contaminante no meio experimental foram recolhidas três alíquotas (10 mL) de meio recém-preparado (0h) e antes de ser renovado (24h) dos dois conjuntos de três tratamentos.

No início de cada experiência sacrificaram-se ainda 12 caranguejos para recolha de tecidos para caracterização dos valores de base dos biomarcadores avaliados (T0).

2.3 Ensaio de alimentação

De forma a avaliar o efeito do ACN e da ANL no comportamento do caranguejo realizaram-se ensaios de alimentação. Os ensaios foram efetuados no sexto dia de ensaio antes da renovação de meio. Para tal, os caranguejos foram separados nos respetivos aquários, com uma rede em cruz que dividia o aquário em quatro secções de

área semelhante. Forneceu-se a cada caranguejo 2 cubos de pota ($\approx 1 \times 1 \times 1$ cm), previamente pesados, a cada 10 min durante um total de 30 min. No fim, os cubos de pota não ingeridos foram recuperados, enxugados com papel absorvente e pesados, determinando-se por diferença o peso de pota ingerida.

2.4 Determinação de biomarcadores

No fim dos ensaios, os caranguejos foram anestesiados em gelo, pesados (g) e medidos (comprimento e largura da carapaça, mm). Recolheram-se em seguida pequenas porções de tecido de cada caranguejo para microtubos (glândula digestiva, gânglio, músculo e brânquias, Figura 7) que foram posteriormente congeladas em azoto líquido e guardadas a -80°C . Estas amostras foram utilizadas na determinação dos diferentes biomarcadores selecionados de acordo com métodos adaptados a *Carcinus maenas* (Rodrigues *et al.*, 2013). Os restantes tecidos moles foram reunidos e congelados a -20°C para quantificação química.

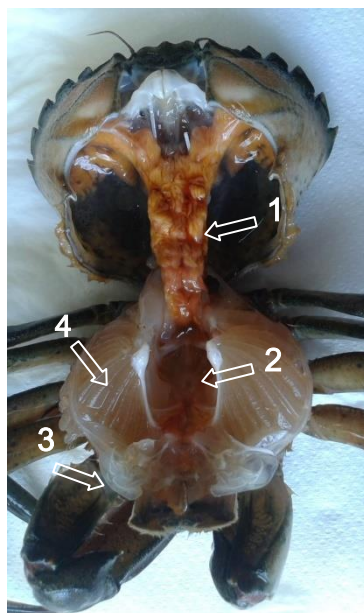


Figura 7. Órgãos internos de *Carcinus maenas*. 1. Glândula digestiva; 2. Gânglio; 3. Músculo; 4. Brânquias.

2.4.1 Compostos, reagentes e equipamentos

Os compostos escolhidos para a preparação do meio experimental contaminado, acrilonitrilo ($\text{C}_3\text{H}_3\text{N}$, N° CAS 107-13-1) e anilina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$, N° CAS 62-53-3), e todos os reagentes utilizados nas análises enzimáticas foram adquiridos na Sigma–Aldrich Chemical (Steinheim, Germany). O reagente de Bradford foi adquirido na Bio-Rad (Munich, Germany). As homogeneizações foram feitas com recurso a um homogeneizador *Precellys24* e para a centrifugação dos homogeneizados utilizou-se uma centrífuga VWR

Micro Star 17R. As determinações em microplaca foram realizadas num espectrofotômetro BioTek Power Wave 340.

2.4.2 Homogeneização de tecidos

O gânglio e uma porção de músculo foram homogeneizados com 500 µL de tampão fosfato 100mM, KCl 150mM, Na₂EDTA 1mM (pH 7.4), a 5600 rpm por 15 segundos, duas vezes, e centrifugados a 6000 g, a 4°C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado para análise da atividade da AChE.

Outra porção de tecido muscular da pata foi homogeneizada com tampão Tris/NaCl (0,1M, pH 7.2) e centrifugado a 6000 g, durante 3 min, a 4°C. O sobrenadante recolhido foi utilizado para a análise da atividade da LDH.

Para a determinação da IDH, uma porção de músculo da pata foi homogeneizada com tampão Tris/NaCl (0,1M, pH 7.8). Este homogeneizado foi centrifugado a 15000 g, durante 15 min, a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido para análise da atividade da IDH.

As amostras de glândula digestiva foram homogeneizadas em 500 µL de tampão fosfato 100mM, KCl 150mM, DTT 1mM, PMSF 0,1 mM, Na₂EDTA 1mM (pH 7.4) a 5600 rpm por 15 segundos, duas vezes. Posteriormente foram centrifugadas durante 20 min a 12000 rpm, a 4°C. O sobrenadante (fração pós-mitocondrial) foi recuperado e separado em diferentes alíquotas para a análise de diferentes biomarcadores (GST, GPx e LPO).

2.4.3 Ensaios enzimáticos e peroxidação lipídica

A atividade da AChE no gânglio e músculo foi determinada de acordo com o método de Ellman *et al.* (1961). Neste método a acetiltiocolina fornecida como substrato é hidrolisada pela AChE presente na amostra originando tiocolina. A tiocolina reage com o 5,5-ditiobis-2-nitrobenzeno (DTNB) formando um composto de cor amarela cuja produção pode ser medida pelo aumento da absorvância observado a 412 nm. A atividade desta enzima foi expressa em nmol, por minuto, por mg de proteína.

A determinação da atividade da enzima LDH foi feita no sobrenadante obtido, seguindo o método de Vassault (1983) adaptado a microplaca. Este método baseia-se na determinação da quantidade de piruvato convertido em lactato pela LDH através da medição a 340 nm da diminuição de absorvância provocada pela simultânea oxidação do NADH que ocorre durante o processo. A atividade foi expressa em nmol, por minuto, por mg de proteína.

Quanto à IDH, a sua atividade foi determinada de acordo com o método de Ellis e Goldberg (1971) adaptado a microplaca. Neste método a atividade é avaliada pela monitorização do aumento da absorvância devido à redução do NADP⁺ a 340 nm. Esta redução leva à regeneração do NADPH que fornece energia necessária à manutenção do

balanço redox da célula. A atividade foi expressa em nmol, por minuto, por mg de proteína.

A atividade das GST foi medida pelo método descrito por Habig *et al.* (1974) adaptado a microplaca. Neste método, as enzimas presentes na amostra catalisam a conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a molécula GSH, dando origem à formação de um tioéter cuja produção pode ser seguida pela medição da absorvância a 340 nm. A atividade das GST foi expressa em nmol por min por mg de proteína.

Quanto à GPx, a sua atividade foi avaliada de acordo com o método descrito por Mohandas *et al.* (1984) adaptado a microplaca. Este método mede a diminuição do NADPH, a 340nm, usando o H₂O₂ como substrato, na presença de glutathione redutase (GR), GSH e NADPH. A atividade da enzima foi expressa em nmol por min por mg de proteína.

Os níveis de LPO foram determinados através do método referido por Ohkawa *et al.* (1979) e Bird e Draper (1984), adaptado a leitura final em microplaca. Este método consiste na quantificação, a 535 nm, das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), como por exemplo, compostos como o malondealdeído (MDA), produzidos pela degradação de produtos formados pela ação de ROS nos lípidos membranares. Os níveis de LPO foram expressos em pmol por mg de proteína.

2.4.4 Medição da concentração de proteína

A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) adaptado a microplaca, usando o reagente Bio-Rad. Como proteína padrão foi usada γ -globulina de bovino (1mg/ml) (Rodrigues *et al.*, 2013). As leituras de absorvância foram efetuadas a 600 nm e a concentração de proteína foi expressa em mg/mL.

2.5 Análises químicas

Ao longo dos dois ensaios foram recolhidas amostras (10 mL) de meio recém-preparado (0h) e de meio antes de ser renovado (24h) dos três tratamentos para confirmação das concentrações de exposição. As amostras foram recolhidas para frascos escuros, nos quais se adicionaram dois gramas de cloreto de sódio (NaCl) (p.a. Merck), e imediatamente fechados com uma tampa com um septo de politetrafluoroetileno (PTFE). Para a dissolução do sal e completa homogeneização, as amostras foram ao vortex durante 30s e foram conservadas a -20 °C até à sua análise, assim como alíquotas das soluções stock. Para a ANL seguiram-se as condições experimentais anteriormente descritas, estando as análises na água e nos tecidos em curso. Amostras compostas de

tecido de caranguejo, de vários indivíduos, foram usadas para a medição de ACN, sendo divididas em 5 réplicas. O tecido foi homogeneizado num misturador Ultra-turrax (Ika).

Para a análise de ACN foi realizada uma microextração de fase sólida em *headspace* (SPME) usando um amostrador automático de modelo CombiPal (CTC Analytics) juntamente com uma fibra de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB, polar) de 65 µm de espessura da Supelco. A extração ocorreu durante 15 min a 40 °C. A quantificação de ACN foi efetuada usando um espectrofotômetro de massa Varian Saturn 2000 (Walnut Creek, CA), acoplado a um cromatógrafo gasoso Varian 3900 equipado com um injetor *split/splitless*, um SPME *liner* (0.75 mm ID), um sistema de septo microseal (Merlin, Half Moon Bay, CA) e uma coluna VF-5ms (60 mm de comprimento x 0.25 mm de diâmetro e 0.25 µm de espessura) da Agilent. O gás de transporte utilizado foi hélio, com elevada pureza (99.9995% da Air Liquid), a um fluxo constante de 1.0 mL/min. A desorção da fibra de SPME foi efetuada a 270 °C de temperatura durante 5 min. O programa da temperatura do forno foi o seguinte: temperatura inicial mantida a 35 °C durante 2 min, seguindo-se um aumento a 8 °C /min até atingir 100 °C e um aumento de 20 °C / min até atingir os 240 °C, a qual foi mantida por 4 min. A linha de transferência da temperatura foi programada a 250 °C e a da *ion trap* a 230 °C. O espectrofotômetro de massa foi operacionado em modo SIM, selecionando a razão massa-carga mais sensível, para cada composto individualmente, de modo a atingir quer os limites de deteção mais baixos, quer a maior sensibilidade. Os padrões de calibração foram preparados usando uma solução reserva de CLP Volatiles Calibration Mix (Supelco). Os limites de deteção encontrados foram: 15 µg/L para as amostras de água e 20 ng/g de peso húmido para as amostras de tecido.

2.6 Análise dos dados

Para investigar potenciais interações entre os compostos testados e a variação de salinidade, os dados foram analisados como descrito por De Conink *et al.*, 2013 e Rodrigues *et al.*, 2014.

Inicialmente os dados foram organizados e inspecionados através de histogramas e de uma análise de valores extremos. As suposições de normalidade e homogeneidade de variância dos dados foram verificadas utilizando o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Levene, respetivamente. Os dados foram primeiro analisados através de análise de variância (ANOVA) a um critério de classificação, utilizando o aquário como critério. Não tendo sido detetado efeito significativo considerou-se que em cada tratamento foram expostos 12 caranguejos. Os dados foram em seguida analisados através de ANOVA a dois critérios de classificação (concentração e salinidade) com interação, num desenho fatorial completo para os biomarcadores. A ANOVA a dois

critérios de classificação foi usada como teste estatístico formal do modelo de ação independente (AI) dos efeitos combinados dos dois fatores (De Coninck *et al.*, 2013). Este modelo tem vindo a ser reconhecido como adequado para prever os efeitos combinados (Rodrigues *et al.*, 2014). Com este objetivo foi aplicada uma transformação logarítmica aos dados, permitindo testar possíveis desvios ao modelo teste de AI. Nos casos em que a interação entre os dois fatores foi significativa, analisou-se o termo de interação para a ocorrência de possíveis efeitos sinérgicos ou antagonistas (ver abaixo). Quando se encontraram diferenças significativas entre as concentrações testadas, a origem das diferenças foi identificada através do teste de comparações múltiplas de Dunnett, tendo como categoria de referência os respetivos controlos. Os valores iniciais obtidos para caranguejos utilizados nas exposições a ACN e a ANL (T0) foram comparados pela realização de testes *t*-Student. O nível de significância escolhido foi de 0.05 para todos os testes estatísticos realizados, tendo estes sido realizados no SPSS v22.0.

A avaliação da interação, concentração x salinidade (ConcSal), foi feita através da aplicação das equações 1 e 2, de acordo com De Coninck *et al.* (2013) e Rodrigues *et al.* (2014). Os efeitos combinados dos dois fatores foram previstos a partir dos efeitos observados nos tratamentos individuais.

1. $E_{\text{ConcSal, previsto}} = E_{\text{Conc}} + E_{\text{Sal}} - E_{\text{Conc}} \times E_{\text{Sal}}$
2. $E_i = (Y_{\text{controlo}} - Y_i) / Y_{\text{controlo}}$, onde E_i é o efeito observado do tratamento i no biomarcador Y relativamente ao controlo. E_i pode ser positivo, se o biomarcador diminuir quando comparado com o controlo, ou negativo, se aumentar quando comparado com o controlo.

O valor previsto de cada biomarcador (Y_{ConcSal}) foi calculado pela combinação das equações 1 e 2, usando as médias aritméticas dos valores observados no controlo (Y_{controlo}), no tratamento com o tóxico (E_{Conc}) e no tratamento com variação de salinidade (E_{Sal}):

$$Y_{\text{ConcSal, previsto}} = (Y_{\text{Conc}} \times Y_{\text{Sal}}) / Y_{\text{controlo}}$$

Assumiu-se como controlo a salinidade de 15 psu representativa de ambiente estuarino e mantida durante o período de aclimação. Foram aceites os desvios significativos do modelo AI, quando a interação concentração x salinidade foi estatisticamente significativa. As interações foram classificadas como: i) sinérgicas se $E_{\text{ConcSal, observado}} > E_{\text{ConcSal, previsto}}$; $E_{\text{ConcSal, observado}} > 0$ ou $E_{\text{ConcSal, observado}} < E_{\text{ConcSal, previsto}}$; $E_{\text{ConcSal, observado}} < 0$; e ii) como antagonistas quando $E_{\text{ConcSal, observado}} < E_{\text{ConcSal, previsto}}$; $E_{\text{ConcSal, observado}} > 0$ ou $E_{\text{ConcSal, observado}} > E_{\text{ConcSal, previsto}}$; $E_{\text{ConcSal, observado}} < 0$.

3. Resultados

3.1 Análises químicas

Nos ensaios foram recolhidas alíquotas de meio de exposição em três momentos distintos (no início do ensaio, após a alteração da salinidade para 5 psu e no fim do ensaio), para controlar e garantir que as condições experimentais se mantiveram constantes ao longo dos ensaios. Estas recolhas foram antes da mudança diária do meio. Os parâmetros temperatura e concentração de oxigénio dissolvido foram também medidos regularmente nos aquários. A temperatura variou entre os 15°C e os 16°C e o oxigénio manteve-se acima dos 80% ao longo dos 7 dias de exposição.

Os níveis de ACN encontram-se apresentados na tabela 3. No controlo (apenas água salobra) os níveis de ACN encontrados foram inferiores ao limite de deteção (LD, 15 µg/L). Nos dois tratamentos, as concentrações de ACN mantiveram-se próximas das concentrações nominais (100 µg/L e 1000 µg/L), indicando que as condições experimentais usadas foram apropriadas, não se observando perdas significativas de ACN por evaporação. Nos tecidos de caranguejo, recolhidos no final do ensaio, não foram detetados níveis mensuráveis de ACN (valores abaixo do LD, 20 ng/g de tecido), indicando que não ocorreu acumulação.

Tabela 3. Níveis de acrilonitrilo (ACN), expressos em µg/L, medidos em alíquotas de água do ensaio recolhidas ao fim de 24h de exposição, antes da renovação diária do meio (Média ± Desvio padrão, n=3)

		Início do ensaio	Após alteração da salinidade	Fim do ensaio
Tratamento	0 mg/L	<LD*	<LD*	<LD*
	0,1 mg/L	101±13	162±62	92±27
	1 mg/L	917±97	914±121	701±33

* LD= limite de deteção.

Relativamente ao ensaio de ANL, as análises químicas à água e tecido não puderam ainda ser efetuadas, de forma que esses resultados não serão apresentados no presente trabalho.

3.2 Mortalidade

As taxas de mortalidade registadas ao longo de ambos os ensaios foram muito baixas, inferiores a 5 %. Mais especificamente, no ensaio com ACN, num total de 72 espécimes morreram três organismos (um no controlo, um na C1 com alteração de salinidade e um na C2 sem alteração de salinidade), equivalendo a uma taxa de

mortalidade de 4,17%. No ensaio com ANL registaram-se dois animais mortos (um no controlo e um na C2 com alteração de salinidade), num total de 72 organismos, equivalendo a uma taxa de mortalidade de 2,78%.

3.3 Biomarcadores de alerta precoce

3.3.1 Organismos do Tempo zero

Os resultados dos biomarcadores testados nos organismos do tempo zero (T0) estão apresentados na tabela 4. Tendo em conta que estes organismos foram recolhidos em diferentes alturas do ano (inverno para o ensaio com ACN e início da primavera para o ensaio com ANL), os dados dos organismos utilizados em ambos os ensaios foram comparados (teste *t*-student, $p < 0.05$) de modo a perceber se a estação do ano poderia ter influência na atividade enzimática e comportamento (alimentação) dos organismos. Diferenças significativas foram observadas apenas para a atividade da LDH, IDH, GST e os níveis de LPO. Para a LDH os caranguejos do T0 do ensaio com ANL apresentaram valores cerca de 25% mais elevados do que os caranguejos de T0 do ensaio com ACN. Para a IDH, GST e LPO os valores dos caranguejos de T0 do ensaio com ANL foram entre 30 a 50% mais baixos do que os apresentados pelos caranguejos de T0 do ensaio com ACN. Para os restantes biomarcadores não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de animais.

Tabela 4 Valores (Média \pm Desvio padrão) relativos ao ensaio de alimentação, à atividade de enzimas de neurotransmissão (acetilcolinesterase medida no gânglio (AChE_g) e no músculo (AChE_m)), de produção energética (lactato desidrogenase (LDH) e da isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (IDH)), de biotransformação (glutathione S-transferase (GST)) e de defesas antioxidativas (glutathione peroxidase (GPx)) e aos níveis de peroxidação lipídica (LPO) medidos nos tecidos de caranguejos no início dos ensaios (T0). Resultados dos testes *t*-student (*P*) efetuados para verificar diferenças entre os biomarcadores testados em ambos os ensaios (Acrilnitrilo (ACN) e Anilina (ANL), significância ($P < 0,05$) indicada a negrito).

Biomarcadores	ACN	ANL	<i>P</i>
Alimentação	7,33 \pm 1,46	5,03 \pm 1,01	0,088
AChE_g	387,44 \pm 67,13	350,50 \pm 59,99	0,688
AChE_m	17,96 \pm 1,22	21,31 \pm 4,11	0,445
LDH	114,33 \pm 7,98	142,89 \pm 9,95	0,036
IDH	16,77 \pm 2,88	7,36 \pm 0,93	0,005
GST	55,19 \pm 8,97	24,69 \pm 7,28	0,015
GPx	10,96 \pm 0,77	10,68 \pm 0,84	0,806
LPO	181,93 \pm 13,81	120,65 \pm 15,55	0,009

3.3.2 Acrilonitrilo

Globalmente, a ANOVA a dois critérios revelou efeitos significativos da interação concentração x alteração de salinidade (AS) na atividade da AChE_g, AChE_m e GST. Observaram-se efeitos significativos da concentração na atividade da LDH e GPx. Para os parâmetros de alimentação, atividade da IDH e níveis de LPO não foram observados efeitos significativos induzidos pela concentração de HNS, pela alteração de salinidade ou pela interação entre ambos os fatores (Tabela 5).

Os resultados relativos ao ensaio de alimentação realizado para avaliar possíveis efeitos do ACN no comportamento alimentar dos caranguejos estão apresentados na tabela 5 e na figura 8. Não se observaram diferenças significativas, entre tratamentos, na quantidade de alimento ingerido num período de 30 minutos. Os resultados indicam que nas condições de ensaio usadas, as concentrações de ACN testadas e a variação de salinidade provocada não tiveram influência significativa no comportamento alimentar dos organismos (Figura 8).

Tabela 5 Resultados da ANOVA a dois critérios efetuada para investigar os efeitos da concentração e da salinidade nos biomarcadores analisados nos tecidos de caranguejos expostos durante 7 dias a água salobra (sem alteração e com alteração de salinidade, AS) contaminada com acrilonitrilo (0, 0,1 e 1 mg/L). Significância ($p < 0,05$) indicada a negrito. (Atividade das enzimas acetilcolinesterase medida no músculo (AChE_m) e gânglio (AChE_g), lactato desidrogenase (LDH), isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (IDH), glutatona S-transferase (GST) e glutatona peroxidase (GPx) e os níveis de peroxidação lipídica (LPO)).

Parâmetro	Fonte de variação	Df	F	P
Alimentação	Acrilonitrilo	2,12	0,003	0,997
	AS	1,12	0,000	0,989
	Acrilonitrilo x AS	2,12	3,487	0,064
AChE_g	Acrilonitrilo	2,66	3.430	0.038
	AS	1,66	6.149	0.016
	Acrilonitrilo x AS	2,66	3.832	0.027
AChE_m	Acrilonitrilo	2,66	5.022	0.009
	AS	1,66	0.289	0.593
	Acrilonitrilo x AS	2,66	9.338	0.000
LDH	Acrilonitrilo	2,66	5.539	0.006
	AS	1,66	0.255	0.615
	Acrilonitrilo x AS	2,66	0.728	0.487
IDH	Acrilonitrilo	2,66	2.628	0.080
	AS	1,66	0.749	0.390
	Acrilonitrilo x AS	2,66	0.692	0.504
GST	Acrilonitrilo	2,66	4.460	0.015
	AS	1,66	0.294	0.590
	Acrilonitrilo x AS	2,66	4.801	0.011

GPx	Acrilonitrilo	2,66	3.199	0.047
	AS	1,66	0.323	0.572
	Acrilonitrilo x AS	2,66	2.611	0.081
LPO	Acrilonitrilo	2,66	0,614	0,544
	AS	1,66	1,022	0,316
	Acrilonitrilo x AS	2,66	2,829	0,066

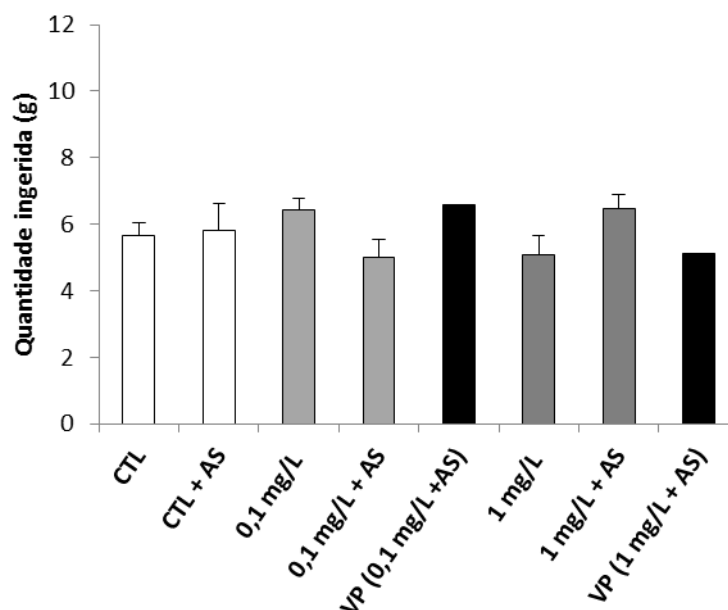


Figura 8 Quantidade de alimento ingerida (média e erro padrão da média) pelos organismos expostos a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada por acrilonitrilo (controle (CTL), 0,1 e 1 mg/L). A barra preta indica o valor previsto (VP) de alimento ingerido para os grupos da interação segundo o modelo de ação independente dos dois fatores testados.

A figura 9 mostra os valores de atividade da AChE no gânglio e no músculo para os diferentes tratamentos testados. Verificou-se uma interação significativa entre a concentração de ACN e a alteração de salinidade tanto na atividade da enzima no gânglio como no músculo (Tabela 5), indicando que ocorreu um efeito da HNS nos caranguejos expostos dependente da variação na salinidade.

Na atividade da AChE no gânglio verificou-se uma influência significativa da salinidade nos controles ($p < 0.05$), tendo ocorrido um aumento da transmissão neuromuscular nos organismos que sofreram a alteração de salinidade (AS). Quanto à influência das concentrações testadas, observou-se um aumento significativo da atividade da enzima no tratamento 0,1 mg/L ACN sem alteração de salinidade, em relação ao controle ($p < 0.05$). A análise da interação relativamente ao modelo de ação independente dos dois fatores revelou efeitos antagonistas (Figura 9) que levaram a uma

atividade mais baixa do que o previsto. No entanto, estes valores foram ainda mais elevados do que os observados nos caranguejos do grupo controlo.

No músculo observou-se uma diminuição significativa da atividade da AChE nos organismos expostos à concentração de ACN mais elevada a 15 psu ($p < 0.05$). No tratamento com variação de salinidade, a atividade da enzima diminuiu significativamente em organismos expostos a 0,1 mg/L ACN, relativamente à exposição a 15 psu. Na concentração mais alta observou-se um aumento significativo da atividade da AChE no grupo que sofreu alteração de salinidade relativamente ao que foi continuamente exposto a 15 psu, mas não significativamente diferente aos valores do controlo.

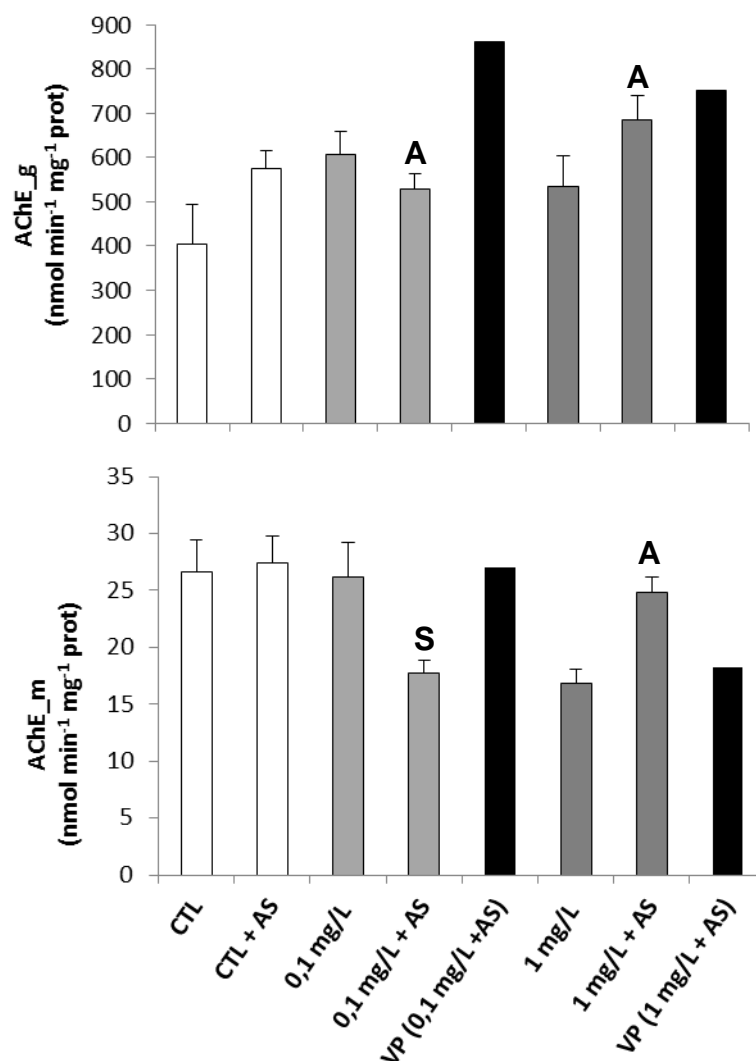


Figura 9 Atividade da acetilcolinesterase (média e erro padrão da média) determinada no gânglio (AChE_g) e no músculo (AChE_m) de caranguejos expostos, durante 7 dias, a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada com acrilonitrilo (controlo (CTL), 0,1 e 1 mg/L). A barra preta indica o valor previsto (VP) de atividade de AChE nos tratamentos com variação de salinidade relativamente ao modelo de ação independente dos dois fatores. As letras S e A indicam sinergismo e antagonismo, respetivamente.

Na atividade da AChE_m foram observados efeitos sinérgicos e antagonistas no tratamento 0,1 mg/L+AS e no 1 mg/L+AS, respetivamente (Figura 9). Os caranguejos no tratamento 0,1 mg/L+AS mostraram uma menor atividade da AChE do que o previsto; pelo contrário no tratamento 1mg/L+AS observou-se uma atividade de enzima superior ao previsto pelo modelo AI. Contudo, nos dois tratamentos ocorreu uma diminuição da atividade de AChE em relação ao controlo.

Observou-se um efeito significativo da exposição ao acrilonitrilo na atividade da LDH, mas não da interação entre concentração e alteração de salinidade (Tabela 5). Na figura 10 verificou-se que a atividade da LDH diminuiu à medida que a concentração de ACN aumentou (Figura 10), verificando-se um efeito significativo da concentração nos tratamentos de 1 mg/L ($\approx 20\%$) ($p < 0.05$).

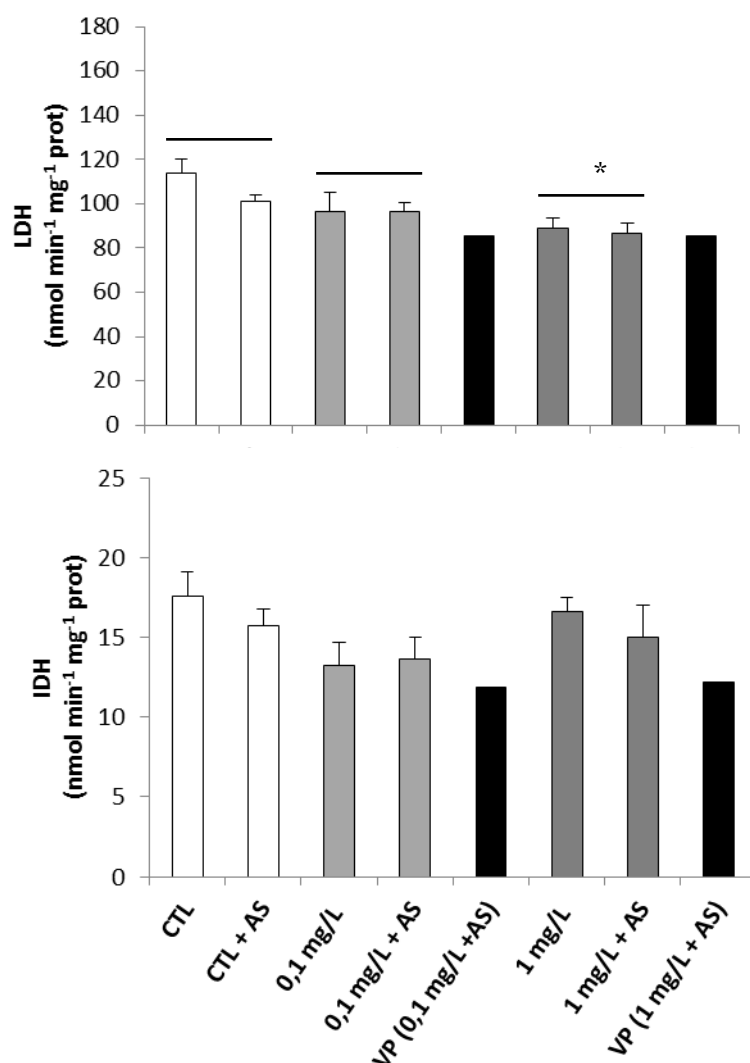


Figura 10 Atividade da lactato desidrogenase (LDH) e da isocitrato desidrogenase dependente do NADP⁺ (IDH, Média e erro padrão da média) determinadas no músculo de caranguejos expostos, durante 7 dias, a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada com acrilonitrilo (controlo (CTL), 0,1 e 1 mg/L). A barra preta indica o valor previsto (VP) de atividade de LDH e de IDH nos tratamentos com variação de salinidade, calculado de acordo com o modelo de ação independente dos dois fatores testados. Diferenças significativas entre concentrações e controlos estão identificadas com um asterisco (*) (ANOVA dois critérios e teste de Dunnett, $P < 0.05$).

Quanto à IDH, não foram verificados efeitos significativos de nenhum dos fatores testados, nem da sua interação, na atividade desta enzima (Tabela 5).

Para as GST, a interação concentração x salinidade mostrou ter um efeito significativo na sua atividade (Tabela 5). Nos tratamentos sem variação de salinidade verificou-se um aumento significativo da atividade da enzima na concentração 0,1 mg/L relativamente ao controlo ($p < 0.05$).

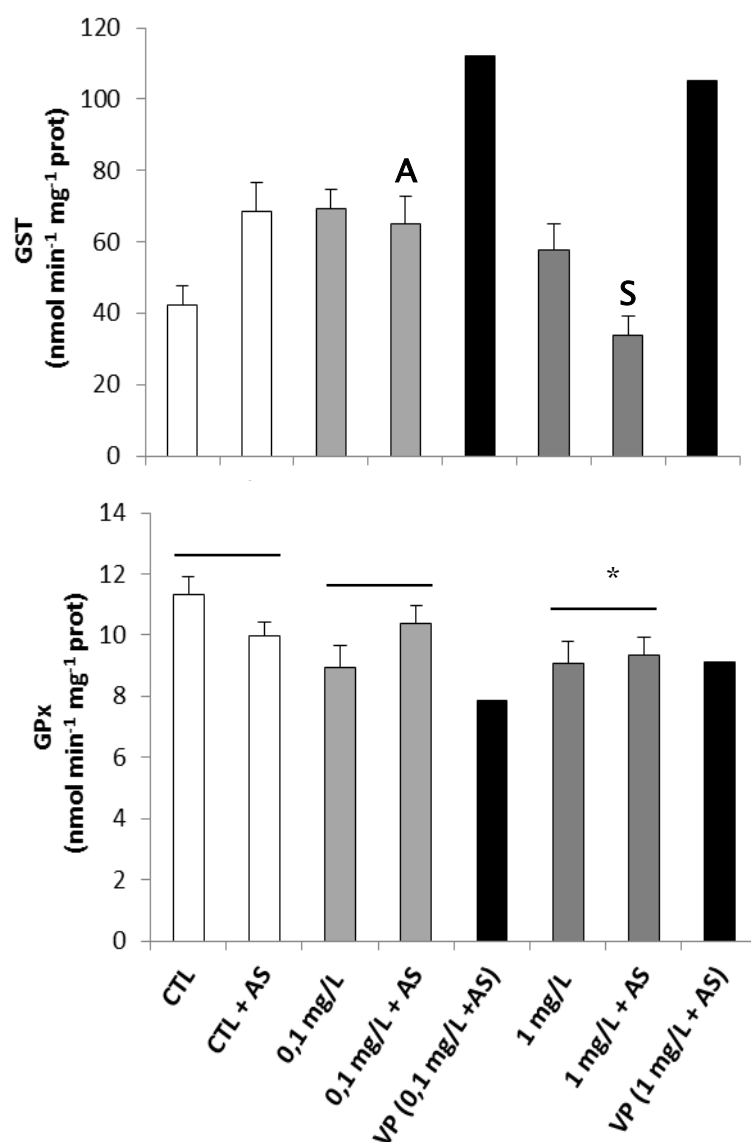


Figura 11 Atividade das glutatona S-transferase (GST) e da glutatona peroxidase (GPx, Média e erro padrão da média) determinadas na glândula digestiva de caranguejos expostos, durante 7 dias, a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada com acrilonitrilo (controlo (CTL), 0,1 e 1 mg/L). A barra preta indica o valor previsto (VP) de atividade de GST e GPx nos tratamentos com variação de salinidade, calculada de acordo com o modelo de ação independente dos dois fatores. As letras S e A indicam sinergismo e antagonismo, respetivamente. Diferenças significativas entre concentrações e controlos estão identificadas com um asterisco (*) (ANOVA dois critérios e teste Dunnett, $P < 0.05$).

Adicionalmente, verificaram-se diferenças significativas nos tratamentos controle e 1mg/L ACN entre os organismos com e sem variação de salinidade, denotando a influência da salinidade na resposta da enzima ao poluente. No entanto, foram encontrados efeitos antagonistas dos dois fatores na atividade das GST no tratamento 0,1mg/L+AS e sinérgicos no tratamento de 1mg/L+AS (Figura 11). A atividade da enzima de biotransformação foi mais baixa do que o previsto na concentração mais baixa de ACN, mas superior ao controle (CTL, Figura 11). Na concentração mais alta, a enzima apresentou uma atividade bastante inferior aos valores previstos pelo modelo AI, sendo inferior ao observado no controle.

Para a GPx, foi encontrada uma influência significativa da exposição ao ACN na atividade desta enzima (Tabela 5). A análise indicou diferenças significativas ($p < 0,05$) na atividade da enzima antioxidativa nos organismos expostos à concentração mais alta relativamente à registada no tratamento controle (CTL, Figura 11). Tal como para a LDH, a variação da salinidade não apresentou influência significativa na atividade da GPx.

Os resultados dos níveis de LPO não indicam diferenças significativas relativamente à concentração, salinidade ou interação entre os dois fatores (Tabela 5). O nível mais elevado de LPO foi encontrado nos caranguejos expostos apenas a água salobra (sem alteração de salinidade, Figura 12).

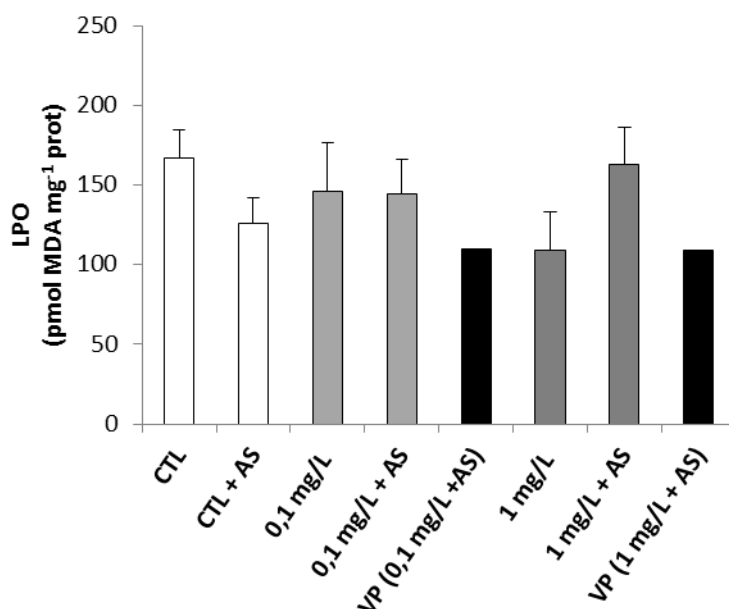


Figura 12 Níveis de peroxidação lipídica (LPO, Média e erro padrão da média) determinados na glândula digestiva de caranguejos expostos, durante 7 dias, a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada por acrilonitrilo (controle (CTL), 0,1 e 1 mg/L). A barra preta indica o valor previsto (VP) de níveis de LPO nos tratamentos com variação de salinidade.

3.3.3 Anilina

No geral, a ANOVA a dois critérios revelou efeitos significativos da interação concentração x alteração de salinidade apenas na atividade da IDH e da GPx. Foram observados efeitos significativos da concentração de anilina na atividade da AChE_g, AChE_m, LDH e nos níveis de LPO. No comportamento alimentar e na atividade das GST não se verificaram efeitos da concentração, nem da alteração de salinidade, nem da sua interação (Tabela 6).

No ensaio com ANL, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de alimento ingerido pelos organismos expostos aos diferentes tratamentos, relativamente à quantidade ingerida pelos organismos controlo (Figura 13). Tal como para o ACN, nas condições experimentais usadas as concentrações de ANL testadas e a variação de salinidade não tiveram influência significativa no comportamento alimentar dos organismos (Tabela 6).

Tabela 6 Resultados da ANOVA a dois critérios efetuada para investigar os efeitos da concentração e da salinidade nos biomarcadores analisados nos tecidos de caranguejos expostos durante 7 dias a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade, AS) contaminada com anilina (0, 5 e 50 µg/L). Significância ($p < 0,05$) indicada a negrito.

(Atividade das enzimas acetilcolinesterase medida no músculo (AChE_m) e gânglio (AChE_g), lactato desidrogenase (LDH), isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (IDH)), glutatona S-transferase (GST) e glutatona peroxidase (GPx) e os níveis de peroxidação lipídica (LPO))

Parâmetro	Fonte de variação	df	F	P
Alimentação	Anilina	2,12	1,604	0,241
	AS	1,12	0,058	0,813
	Anilina x AS	2,12	1,716	0,221
AChE_g	Anilina	2,66	6.765	0.002
	AS	1,66	0.270	0.605
	Anilina x AS	2,66	1.198	0.308
AChE_m	Anilina	2,66	4.171	0.020
	AS	1,66	1.019	0.316
	Anilina x AS	2,66	1.252	0.293
LDH	Anilina	2,66	5.906	0.004
	AS	1,66	2.200	0.143
	Anilina x AS	2,66	0.102	0.903
IDH	Anilina	2,66	2.822	0.067
	AS	1,66	0.346	0.558
	Anilina x AS	2,66	3.282	0.044

GST	Anilina	2,66	0.385	0.682
	AS	1,66	0.451	0.504
	Anilina x AS	2,66	0.166	0.847
GPx	Anilina	2,66	4.050	0.022
	AS	1,66	1.097	0.299
	Anilina x AS	2,66	4.309	0.017
LPO	Anilina	2,66	15.292	0.000
	AS	1,66	0.016	0.951
	Anilina x AS	2,66	0,121	0.140

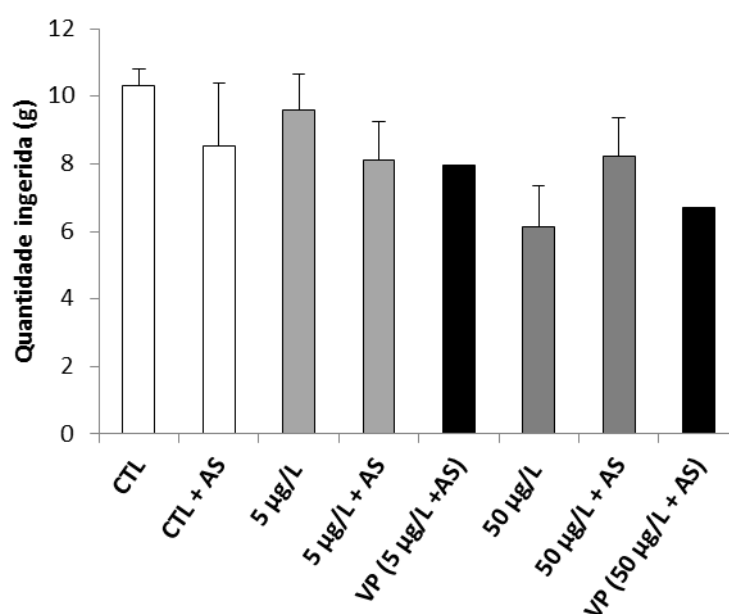


Figura 13 Quantidade de alimento ingerido (média e erro padrão da média) pelos caranguejos expostos a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada com anilina (controle (CTL), 5 e 50 µg/L). A barra preta indica o valor previsto (VP) de quantidade de alimento ingerido nos tratamentos com variação de salinidade, calculado pelo modelo de ação independente dos dois fatores.

As concentrações testadas de ANL apresentaram uma influência significativa na atividade da AChE quer no gânglio quer no músculo. Não se observaram diferenças significativas entre grupos causadas pela alteração de salinidade ou a interação entre os dois fatores (Tabela 6). A figura 14 evidencia estes resultados. No gânglio constataram-se diferenças significativas entre os tratamentos controle e 50 µg/L ANL, observando-se uma diminuição na atividade da enzima ($\approx 34\%$) (teste Dunnett, $p < 0.05$) (Figura 14). No músculo, verificou-se globalmente um aumento gradual da atividade de AChE com o aumento da concentração testada, registrando-se significância entre o controle e a concentração mais elevada (teste Dunnett, $p < 0.05$) (Figura 14).

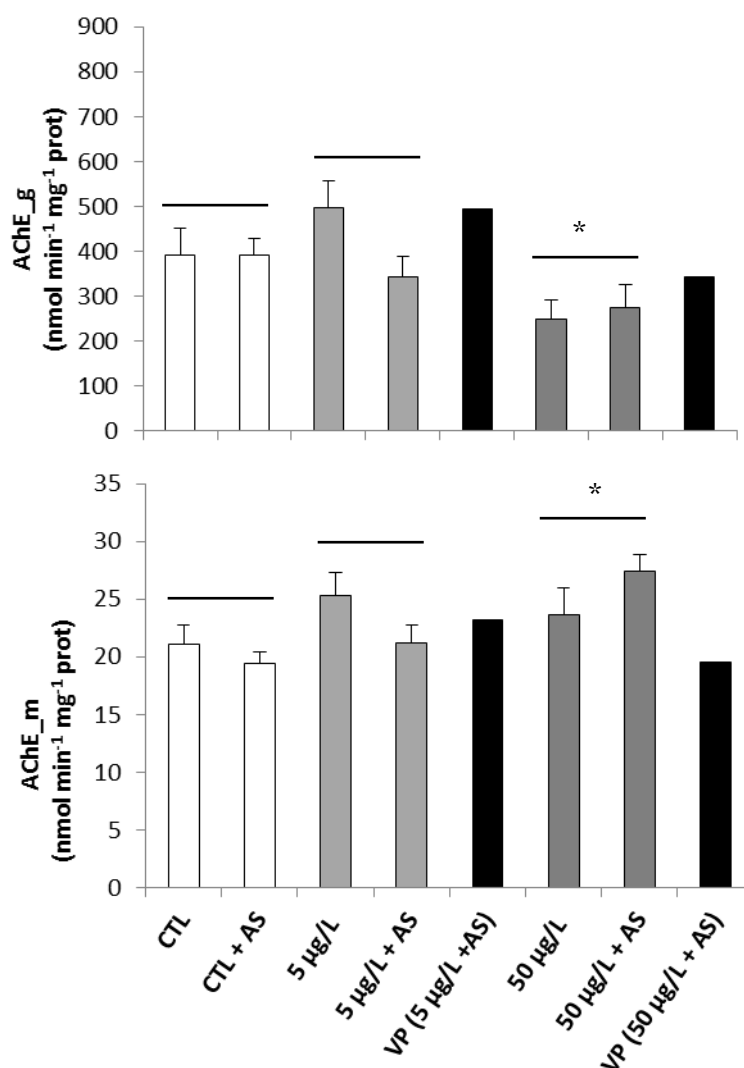


Figura 14 Atividade da acetilcolinesterase (AChE, média e erro padrão) determinada no gânglio (AChE_g) e no músculo (AChE_m) de caranguejos expostos, durante 7 dias, a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada com anilina (controle (CTL), 5 e 50 µg/L). A barra preta indica o valor previsto (VP) de atividade de AChE nos tratamentos com variação de salinidade, calculado pelo modelo de ação independente dos dois fatores. Diferenças significativas entre meios contaminados e controles estão identificadas com um asterisco (*) (ANOVA dois critérios e teste Dunnett, $P < 0.05$).

A atividade da LDH exibiu diferenças significativas somente em relação às concentrações de anilina testadas (Tabela 6), indicando que a alteração de salinidade não influenciou significativamente a sua atividade. A atividade desta enzima diminuiu significativamente com o aumento da concentração (Figura 15). Diferenças significativas foram observadas tanto no tratamento de 5 µg/L ANL como no de 50 µg/L ANL relativamente ao grupo controle (teste Dunnett, $p < 0.05$).

Relativamente à IDH, a sua atividade teve uma influência significativa da interação concentração x alteração de salinidade (Tabela 6). No tratamento sem alteração de salinidade foram registadas diferenças significativas na atividade da enzima dos organismos expostos à concentração mais alta ($p < 0.05$), comparando com o grupo controle (CTL, Figura 15). Comparando os tratamentos 5 µg/L ANL com e sem variação

de salinidade verificou-se uma diminuição significativa ($\approx 40\%$) na atividade de IDH nos organismos sujeitos, para além do meio contaminado, à alteração de salinidade (Figura 15). Foram encontrados efeitos sinérgicos na atividade IDH de caranguejos expostos ao tratamento $5\mu\text{g/L}+\text{AS}$ e efeitos antagonistas nos animais do grupo $50\mu\text{g/L}+\text{AS}$. Comparado com o valor previsto pelo modelo AI, a atividade da IDH foi inferior no tratamento $5\mu\text{g/L}+\text{AS}$ e superior no tratamento $50\mu\text{g/L}+\text{AS}$ (Figura 15), embora em ambos os casos tenha sido inferior aos valores do controlo (CTL, Figura 15). Estes resultados indicam uma resposta diferente do biomarcador à exposição combinada para concentrações baixas e elevadas da HNS.

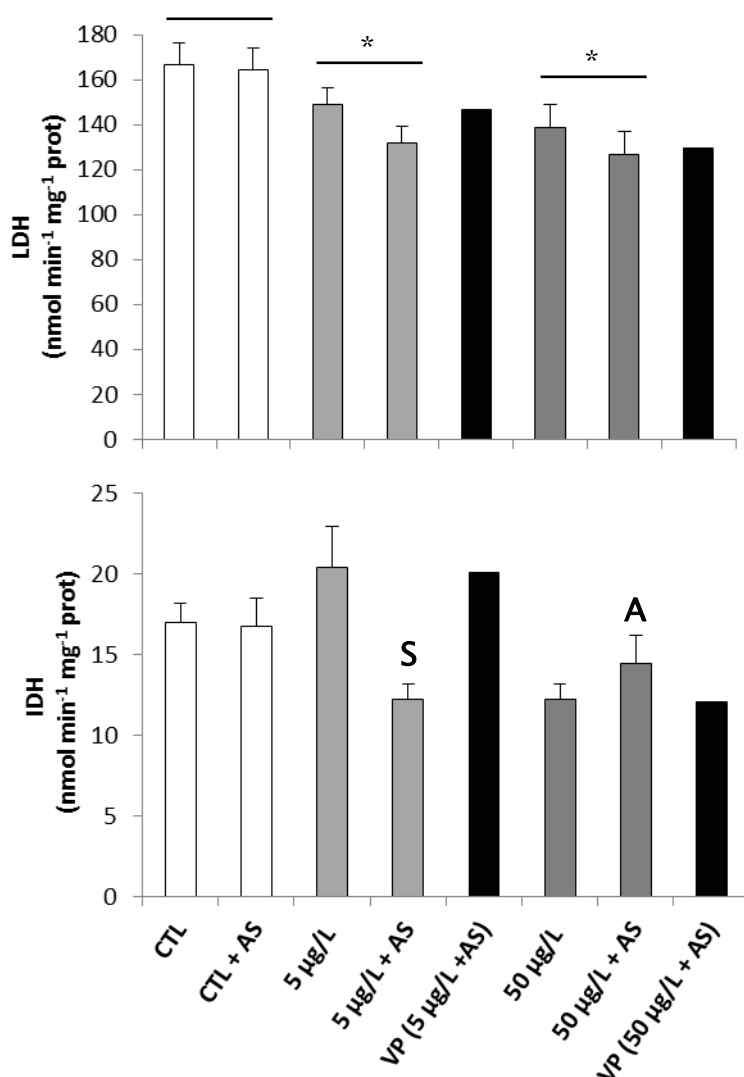


Figura 15 Atividade da lactato desidrogenase (LDH) e da isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺(IDH, média e erro padrão da média) determinadas no músculo de caranguejos expostos, durante 7 dias, a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada com anilina (controlo (CTL), 5 e 50 $\mu\text{g/L}$). A barra preta indica o valor previsto (VP) de atividade de LDH e de IDH nos tratamentos com variação de salinidade, calculada de acordo com o modelo de ação independente dos dois fatores. As letras S e A indicam sinergismo e antagonismo, respetivamente. Diferenças significativas entre concentrações e controlos estão identificadas com um asterisco (*) (ANOVA dois critérios e teste Dunnett, $P < 0.05$).

Ao contrário dos resultados obtidos para o ACN, não foram detetados efeitos significativos da anilina na atividade das GST para nenhum dos fatores testados ou a sua interação (Tabela 6, Figura 16).

Para a GPx foi encontrado um efeito significativo da interação entre a concentração e a alteração de salinidade (Tabela 6). No tratamento sem variação de salinidade observou-se uma diminuição significativa na atividade da GPx na glândula digestiva dos organismos expostos a 5 µg/L ANL em relação ao controlo e à concentração mais elevada ($p < 0.05$). Na concentração de 5 µg/L verificou-se um aumento significativo ($\approx 33\%$) de atividade nos organismos sujeitos à alteração de salinidade relativamente aos do tratamento sem alteração ($p < 0.05$).

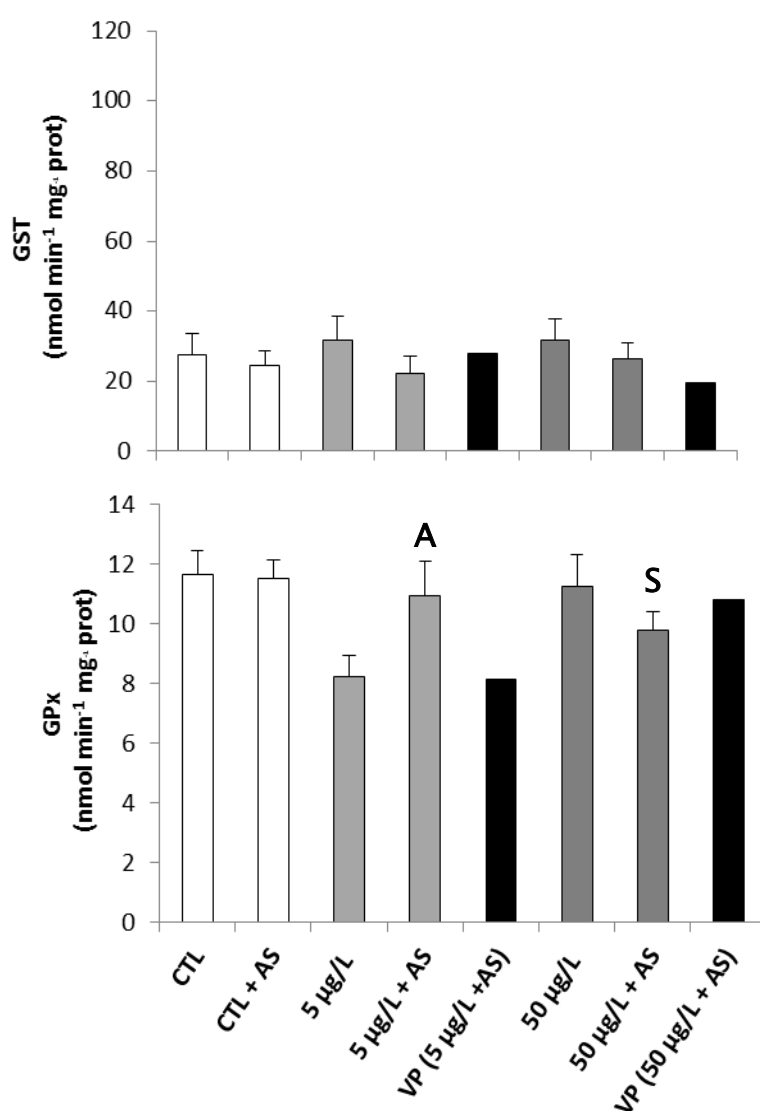


Figura 16 Atividade das glutathionas S-transferases (GST) e da glutathione peroxidase (GPx, média e respetivo erro padrão) determinadas na glândula digestiva de caranguejos expostos, durante 7 dias, a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada com anilina (controlo (CTL), 5 e 50 µg/L). A barra preta indica o valor previsto (VP) de atividade de GST e GPx nos tratamentos com variação de salinidade segundo o modelo de ação independente dos dois fatores. As letras S e A indicam sinergismo e antagonismo, respetivamente.

Efeitos antagonistas na atividade da GPx foram observados no tratamento 5µg/L+AS, resultando num valor de atividade semelhante ao do controlo. Efeitos sinérgicos foram observados no tratamento 50µg/L+AS, tendo sido medida nestes animais atividade mais baixa do que no grupo controlo (CTL, Figura 16).

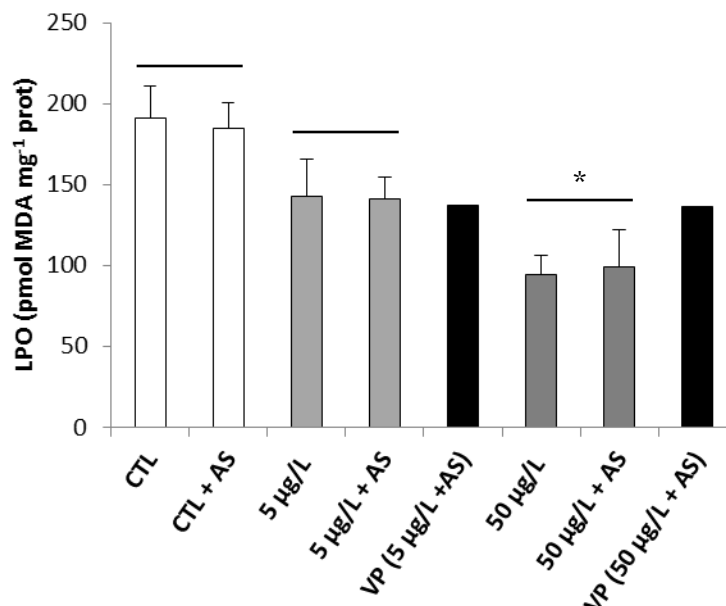


Figura 17. Níveis de peroxidação lipídica (LPO, média e erro padrão da média) determinados na glândula digestiva de caranguejos expostos, durante 7 dias, a água salobra (sem alteração de salinidade e com alteração de salinidade (AS)) contaminada com anilina (controlo (CTL), 5 e 50 µg/L). A barra preta indica o valor de LPO previsto (VP) nos tratamentos com variação de salinidade segundo o modelo de ação independente dos dois fatores. Diferenças significativas entre as concentrações de anilina testadas e os controlos estão identificadas com um asterisco (*) (ANOVA dois critérios e teste Dunnett, $P < 0.05$).

Os níveis de LPO determinados na glândula digestiva dos caranguejos expostos a ANL estão apresentados na figura 17. Os resultados da análise estatística, apresentados na tabela 6, indicam uma influência significativa desta HNS na resposta dos animais expostos. Analisando o gráfico (Figura 17), constata-se que, na generalidade, ocorreu um decréscimo no dano oxidativo dos lípidos à medida que a concentração de ANL aumentou. Observaram-se inclusive diferenças significativas entre o tratamento 50 µg/L ANL e o grupo controlo (teste Dunnett, $p < 0.05$) (Figura 17), verificando-se um decréscimo de cerca de 50% dos níveis de LPO.

4. Discussão

O acrilonitrilo e a anilina estão presentes no ambiente aquático devido principalmente a descargas industriais, mas também por ocorrência de derrames consequentes de acidentes envolvendo barcos de transporte destas substâncias ou da sua transferência em portos (EURAR, 2004a, 2004b, Neuparth *et al.*, 2011). Estes dois compostos químicos são frequentemente transportados via marítima e sabe-se que ambos podem induzir toxicidade em diversos organismos (Neuparth *et al.*, 2011), deste modo o risco ecológico associado aos seus derrames é considerável. Contudo, são poucos os estudos disponíveis sobre os mecanismos de toxicidade do ACN e da ANL em organismos marinhos e estuarinos, e o conhecimento existente sobre os seus efeitos é ainda muito escasso. Tendo em conta que estas HNS possuem características físicas e químicas distintas, comportando-se de modo diferente quando derramadas no meio marinho, torna-se importante investigar e avaliar o seu potencial tóxico.

No seu *habitat* natural, os organismos estão regularmente sujeitos a diversos fatores de stress bióticos (*e.g.*, microrganismos, parasitas) e abióticos (*e.g.*, temperatura, níveis de nutrientes, salinidade). Estes stressores naturais podem inclusive potenciar ou diminuir os efeitos de poluentes químicos nos organismos aquáticos (Heugens *et al.*, 2001; De Coninck *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014a). Por isso, em áreas afetadas por contaminação química, os efeitos combinados dos diferentes fatores de stress e dos poluentes nos organismos são normalmente difíceis de prever a partir dos seus efeitos individuais, devido às possíveis interações que podem ocorrer (De Coninck *et al.*, 2013). Os Comitês Científicos Europeus para a avaliação de risco para a saúde humana e ambiental (SCHER, 2013) aconselham o uso de condições o mais próximas possíveis do *habitat* natural dos organismos em bioensaios experimentais, de modo a que o conhecimento produzido seja preciso e suporte a previsão dos efeitos induzidos em organismos aquando a contaminação do meio marinho.

Neste trabalho são apresentados os resultados de ensaios conduzidos com um invertebrado marinho e estuarino modelo, *C. maenas*. Espécimes deste organismo foram expostos a ACN ou a ANL em dois contextos diferentes. Isto é, num contexto, em que se utilizaram condições típicas de ensaios ecotoxicológicos comumente utilizados na avaliação de risco ambiental, em que as condições de exposição se mantêm estáveis ao longo de todo o ensaio. E, num contexto em que durante o período de exposição ao tóxico se produziu uma variação forte e curta de um fator abiótico com grande relevância no contexto estuarino, a salinidade, simulando por exemplo uma situação de chuva intensa como tem sido frequente no cenário atual de instabilidade climática. Os dados obtidos pretendem contribuir para o aumento do conhecimento sobre os modos de ação e

os possíveis efeitos nefastos induzidos por estas HNS, mas também avaliar a potencial interação entre estes dois tipos de stressores em respostas bioquímicas dos organismos expostos. Variações acentuadas de salinidade podem afetar o balanço redox dos organismos, incluindo de *C. maenas*, devido à provável formação de ROS, podendo induzir uma variedade de respostas fisiológicas nos mesmos, como alterações na neurotransmissão, metabolismo energético, biotransformação e defesas antioxidativas (Lushchak, 2011; Rodrigues *et al.*, 2012). A salinidade pode ainda interagir com vários contaminantes, alterando a sua toxicidade. Em diversos estudos efetuados com organismos aquáticos foram verificadas interações, nomeadamente, correlações negativas, observando-se frequentemente um aumento da toxicidade dos compostos com a diminuição de salinidade (Heugens *et al.*, 2001).

Neste trabalho foram estudados os efeitos potencialmente induzidos pelo ACN e a ANL, tendo-se selecionado um parâmetro comportamental e diversos parâmetros bioquímicos como biomarcadores de alerta precoce de exposição/efeito. Como supracitado, a mortalidade tem sido um dos parâmetros mais avaliados em estudos de toxicidade com organismos aquáticos (Rocha *et al.* submetido). No entanto, a avaliação de efeitos sub-letais mostra-se importante para suportar o cálculo de limites de referência ambientais que garantam a proteção dos ecossistemas. Desta forma, nos ensaios realizados foram selecionadas concentrações pouco suscetíveis de causar mortalidade no organismo teste. Para um ensaio de exposição de curta duração ser considerado válido a mortalidade nos grupos controlo deve ser inferior a 10% (Commons *et al.*, 1996). Neste trabalho, as taxas de mortalidade registadas globalmente nos ensaios foram consideravelmente baixas (4,17% para o ACN e de 2,78% para a ANL). Além disso, tanto os níveis de pH como de oxigénio dissolvido na água mantiveram-se estáveis ao longo da duração dos ensaios. Para os níveis de oxigénio dissolvido, em particular, registaram-se sempre valores acima dos limites vitais para a espécie. Pode assim considerar-se os estudos válidos.

Os ensaios foram realizados com organismos recolhidos em diferentes estações do ano (Inverno e Primavera), estando possivelmente no momento de recolha sujeitos a diferentes condições ambientais. As diferenças estatísticas registadas nalguns dos biomarcadores analisados, nomeadamente, a atividade de LDH, IDH, GST e nos níveis de LPO nos organismos do T0 parecem traduzir esta variabilidade sazonal de fatores bióticos e abióticos do estuário. Estes dados estão, contudo, em concordância com o padrão de variação observado previamente noutros trabalhos com esta e outras espécies, nos quais se mediram respostas destes biomarcadores em organismos recolhidos em diferentes alturas do ano (Guimarães *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2014b).

4.1. Biomarcadores de alerta precoce

4.1.1. Parâmetro comportamental

Alimentação

Ensaio de alimentação durante ou após a exposição a um contaminante têm sido utilizados com sucesso para avaliar os seus efeitos e risco para diversos organismos aquáticos (Moreira *et al.*, 2006). De facto, a avaliação do comportamento alimentar tem uma elevada relevância ecológica, uma vez que alterações a nível individual induzidas por um contaminante poderão levar a repercussões graves a nível populacional (crescimento, reprodução, sobrevivência) (Moreira *et al.*, 2006).

Nos ensaios realizados, o comportamento alimentar não parece ser afetado pela exposição aos tóxicos testados, simples ou em combinação com a variação de salinidade, uma vez que não foram detetadas diferenças significativas na quantidade de comida ingerida pelos organismos após as exposições. Estes dados sugerem que, para as concentrações testadas e para a variação de salinidade, não houve impacto significativo no sistema nervoso, disponibilidade energética ou saúde geral dos caranguejos que possa levar a alterações no seu comportamento alimentar. A neurotoxicidade do ACN é reconhecida por diversos autores (Ghanayem *et al.*, 1991; Esmat *et al.*, 2007).

Relativamente à ANL, estudos conduzidos com espécimes de tilápia, *Oreochromis mossambicus*, indicam um potencial efeito no comportamento alimentar da espécie, tendo sido observado uma diminuição significativa da quantidade de comida ingerida em espécimes expostas durante 96 horas a concentrações entre 0,02 e 6,94 mg/L de ANL (Bhunia *et al.*, 2003). É de notar contudo que em ambos os casos, os estudos encontrados na literatura utilizam vertebrados (rato, tilápia) como organismo teste. Nestes animais, os primeiros passos na metabolização e eliminação do ACN e da ANL são catalizados por enzimas do citocromo P450 (e.g., CYP2E1) (Kedderis e Batra, 1993; CEPA, 1994, 2000; EURAR, 2004b). Mais ainda estas espécies são reconhecidas pela elevada atividade de enzimas da família citocromo P450 que apresentam. No entanto, comparativamente, nos invertebrados aquáticos os níveis totais de CYP são bastante mais baixos resultando muito provavelmente numa menor conversão dos compostos parentais. O facto de não ter sido detetada acumulação de ACN nos tecidos sugere ainda que os caranguejos poderão estar a metabolizar o composto por vias distintas das utilizadas por vertebrados que impedem a sua acumulação. Alternativamente, os compostos poderão estar a ser ativamente detoxificados nas brânquias dos caranguejos expostos. Embora a metabolização seja em geral mais elevada na glândula digestiva, a detoxificação nas brânquias poderá constituir uma primeira linha de defesa nestes

animais minimizando a circulação do contaminante no seu organismo. Os resultados obtidos para este parâmetro são consistentes com os resultados obtidos para a atividade dos biomarcadores de neurotransmissão.

4.1.2. Parâmetros bioquímicos

Neurotransmissão

A atividade da AChE tem vindo a ser utilizada frequentemente como biomarcador de neurotoxicidade em estudos de campo e de laboratório com invertebrados (Cajaraville *et al.*, 2000; Guilhermino *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2012). No caranguejo verde, a sua atividade está relacionada com a transmissão colinérgica quer no sistema nervoso central quer nas junções neuromusculares (Rodrigues *et al.*, 2013; 2015). A inibição da atividade desta enzima pode conduzir a sérios danos, afetando a locomoção do organismo e podendo ainda levar à sua morte. Alterações a nível da atividade da AChE poderão ter assim implicações não só a nível do indivíduo mas também a nível populacional. Nos ensaios efetuados, os valores de atividade de AChE determinados quer no gânglio quer no músculo dos organismos controlo, no final dos ensaios estão de acordo com valores obtidos noutros estudos realizados com *C. maenas* recolhidos no mesmo local de amostragem e testados em condições experimentais semelhantes (Rodrigues *et al.*, 2014; 2015).

A AChE está descrita como sendo muito sensível a pesticidas organofosforados e carbamatos, mas também a alguns metais e a agentes surfactantes (Guilhermino *et al.*, 2000; van der Oost *et al.*, 2003; Frasco *et al.*, 2005). No ensaio com ACN foram encontrados efeitos significativos da interação (concentração x alteração de salinidade) na atividade da AChE tanto no gânglio como no músculo. No gânglio verificou-se um aumento da atividade da AChE em relação ao controlo, principalmente no tratamento 0,1 mg/L ACN ($\approx +49\%$), que pode indicar uma resposta fisiológica de proteção à exposição ao composto. No entanto, efeitos antagonistas foram encontrados indicando que a interação dos dois fatores levou a uma diminuição da transmissão colinérgica prevista pelo modelo de ação independente. No músculo, verificaram-se efeitos sinérgicos no tratamento 0,1mg/L+AS e efeitos antagonistas no tratamento 1mg/L+AS. A atividade da AChE apresentou ainda diferenças significativas entre ambas as concentrações testadas com e sem alteração de salinidade, denotando estes resultados uma possível resposta significativa ao stress causado pela salinidade. No tratamento 1mg/L+AS, a atividade da AChE registada no músculo foi maior do que a prevista (efeito antagonista) pelo modelo teórico de ação independente que pressupõe que os dois stressores atuam no animal por vias ou modos de ação distintos. Esta indução de atividade ($\approx +35\%$) poderá estar relacionada com uma necessidade de aumento da atividade locomotora do caranguejo

em resposta ao stress a que está sujeito, com consequente estimulação da via colinérgica. Estudos prévios mostraram que *C. maenas* responde a níveis de salinidade muito baixos com um aumento da locomoção numa tentativa de evitar esta exposição, muito mais dispendiosa em termos de osmoregulação (Sorenson, 1973; Rodrigues et al., 2012). O caranguejo verde é um reconhecido osmoconformador que pode começar a hiperosmorregular a salinidades abaixo de 25.5–27 psu pelo transporte ativo nas brânquias de sais do meio ambiente para manter a pressão osmótica e concentrações iónicas (Na^+ , Cl^-) na hemolinfa superiores à da água exterior (Towle, 1997; Henry et al., 2003; Cieluch et al., 2004). Por outro lado, o ACN é um reconhecido neurotóxico para animais e humanos, no entanto os seus efeitos na atividade da AChE continuam controversos. Alguns autores consideram que o ACN pode causar toxicidade colinérgica através da mimetização da acetilcolina ou através da inibição da AChE (Yuanqing et al., 2013). Porém em estudos com ratos foi sugerida que a neurotoxicidade induzida, envolve uma sobre-estimulação do sistema colinérgico (Ghanayem et al., 1991).

No ensaio de ANL, a salinidade não teve uma influência significativa na atividade da AChE quer no gânglio quer no músculo. No entanto, a exposição à concentração mais elevada de anilina (50 µg/L) causou inibição da atividade da AChE no gânglio e indução da atividade no músculo. A ANL poderá assim induzir efeitos neurotóxicos no caranguejo, tal como foi, verificado para outras espécies aquáticas nomeadamente o góbio comum, *Pomatoschistus microps* e o camarão-branco-legítimo, *Palaemon serratus* (Luís e Guilhermino, 2012).

Metabolismo energético

As enzimas LDH e IDH estão ambas envolvidas na respiração celular, na via anaeróbica e via aeróbica, respetivamente. A atividade de LDH determinada nos organismos controlo, no final dos ensaios, apresentou valores próximos aos de estudos anteriores realizados em condições semelhantes (Rodrigues et al., 2014a; 2015). Quanto à atividade da IDH, os valores obtidos são superiores aos registados noutros estudos para o mesmo organismo (Rodrigues et al., 2012; 2015).

No ensaio com ACN, a variação de salinidade não provocou alterações significativas na atividade da LDH e da IDH. Da mesma forma, Rodrigues et al. (2012) não detetaram efeitos significativos da salinidade na atividade da IDH em *C. maenas* recolhidos no mesmo local (rio Minho). No entanto, a baixa salinidade (8 e 10 psu) um aumento significativo na atividade da LDH foi registado tanto em *C. maenas* (Rodrigues et al., 2012) como em *C. cragon* (Menezes et al., 2006), respetivamente.

Pelo contrário, a exposição a ACN alterou a atividade da LDH, observando-se uma diminuição significativa nos organismos expostos a 1 mg/L ACN. A LDH é

particularmente importante no caso de ser necessário uma quantidade considerável de energia adicional para lidar com a detoxificação (Diamantino *et al.*, 2001). No entanto, neste caso, assistiu-se a uma ligeira inibição ($\approx 19\%$) da atividade da enzima pela exposição ao ACN. A IDH é considerada a via mais eficiente de produção de ATP, no entanto a sua atividade pareceu não ser afetada pela exposição ao ACN. A IDH é ativa no sistema de defesas antioxidativas, fornecendo o NADPH necessário para a regeneração da GSH pela GR (Rodrigues *et al.*, 2015).

De acordo com estudos em vertebrados, o cianeto, um dos principais metabolitos do ACN pode bloquear a utilização aeróbica de oxigénio (Olson, 2007). Os resultados obtidos parecem pois apoiar a hipótese de existência de vias de metabolização distintas nestes crustáceos, relativamente aos vertebrados aquáticos. A análise de biomarcadores de detoxificação nas brânquias contribuirá para esclarecer esta questão. Será também importante verificar se a inibição da LDH poderá ter consequências nefastas para os organismos em exposições mais prolongadas ao ACN.

No ensaio com ANL, não se verificou influência da salinidade na atividade da LDH à semelhança do que se verificou no ACN. No entanto, a ANL parece afetar a atividade desta enzima, observando-se uma inibição da enzima ($\approx 20\%$). Alterações energéticas foram também registadas noutras espécies aquáticas, *P. microps* e com *P. serratus*, num ensaio de curta duração de exposição a ANL (Luís e Guilhermino, 2012). Na atividade da IDH foram encontrados efeitos de interação distintos, sinérgicos para a baixa concentração de ANL e antagonistas para a concentração mais elevada. Estes resultados indicam uma influência significativa da salinidade nos efeitos da ANL dependente da concentração de exposição.

Biotransformação e defesas antioxidativas

O metabolismo e a toxicocinética do ACN estão razoavelmente compreendidos em ratos e humanos (Neuparth *et al.*, 2013), no entanto em peixes e invertebrados aquáticos o mesmo não acontece. Num dos poucos trabalhos disponíveis sobre os efeitos do ACN em espécies marinhas e estuarinas, Neuparth *et al.* (2013) verificaram que esta HNS provocou alterações na atividade de diversas enzimas (e.g. na atividade da catalase (CAT), GST e superóxido dismutase (SOD)) no fígado de juvenis de *Dicentrarchus labrax* expostos durante 15 dias ao contaminante. Valores de NOEC de 0.15 mg/L para a SOD e GST e 0.75 mg/L para a CAT, e valores de LOEC de 0.75 mg/L para a SOD e GST e 2 mg/L para a CAT foram encontrados por estes autores, dentro da ordem de grandeza das concentrações de exposição usadas neste trabalho.

As GST são enzimas da fase II da biotransformação que catalisam a conjugação de contaminantes como o ACN, ou os seus metabolitos com a GSH, facilitando a sua

excreção. Além disso, esta enzima tem um papel importante na proteção contra o stress oxidativo (Fournier, 1992; van der Oost *et al.*, 2003). A GPx converte o H_2O_2 em água, promovendo a formação de GSSG, pela oxidação da GSH, e atuando como um sistema de defesa que inibe a formação de radicais. Esta enzima tem assim um papel importante na proteção das membranas contra danos oxidativos (Rodrigues *et al.*, 2012). Neste trabalho, a atividade das GST foi influenciada pela interação significativa da concentração de ACN e da salinidade, tendo-se encontrado também efeitos diferentes, antagonistas e sinérgicos, para as concentrações testadas. Na GPx verificou-se somente a influência significativa da concentração de ACN, observando-se uma inibição ($\approx 14\%$) na atividade da enzima. Tendo em conta o papel antioxidante da GPx e que uma das principais vias de metabolização do ACN é a conjugação com a GSH, a estimulação da atividade de ambas as enzimas seria o cenário esperado, assim como o registado em Neuparth *et al.* (2013), como referido anteriormente. Esta resposta poderá ser justificada por uma depleção excessiva de GSH, um dos conhecidos efeitos do ACN (Watcharasit *et al.*, 2010). Adicionalmente, tendo em conta que o ACN não parece ter causado indução da IDH, a quantidade de NADPH produzida poderá ser limitante da regeneração da GSH a longo prazo (Jo *et al.*, 2001). Na atividade das GST, a salinidade parece ainda potenciar a toxicidade do ACN, verificando-se uma diminuição da atividade da enzima em relação ao previsto pelo modelo AI. A alteração de salinidade pode estar associada a uma inibição de enzimas antioxidantes (Rodrigues *et al.*, 2012): os dados deste estudo parecem indicar um efeito da alteração intensa e rápida de salinidade na atividade desta enzima.

No ensaio de ANL, não foram observados efeitos na atividade das GST induzidos pelo contaminante ou pela salinidade. Pelo contrário, Luís e Guilhermino (2012) reportaram diferenças nas enzimas de biotransformação em *P. microps* e *P. serratus* expostos a ANL. Estudos prévios realizados com *C. maenas* verificaram que a salinidade (Rodrigues *et al.*, 2012; 2014) não parece afetar a atividade da GPx. Neste trabalho, observaram-se efeitos combinados da variação de salinidade e da ANL, antagonistas e sinérgicos. Estas alterações resultaram, porém, em níveis de atividade próximos aos dos animais controlos minimizando os efeitos adversos da ANL na atividade da enzima, sobretudo a concentrações mais baixas.

Danos oxidativos

A LPO é uma importante medida do stress oxidativo que pode ser causado pela exposição a contaminantes ambientais (van der Oost *et al.*, 2003), razão pela qual tem vindo a ser utilizada como ferramenta em estudos com *C. maenas* e outros organismos (Lima *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2009; Aguirre-Martínez *et al.*, 2013). No ensaio do

ACN os níveis de LPO não sofreram alterações significativas apesar da exposição dos organismos ao contaminante, da alteração de salinidade e da inibição da atividade de GST e GPx. Estudos demonstram que a exposição a ACN poderá induzir produção de ROS (Watcharasit *et al.*, 2010). Considerando os resultados obtidos, o stress induzido pelo combinação do ACN e a variação acentuada de salinidade não terá sido suficiente para exceder as defesas antioxidativas do organismo. Por outro lado, outras enzimas poderão estar envolvidas no combate ao stress oxidativo (e.g. CAT, SOD, GR) evitando assim danos oxidativos nos lípidos.

Relativamente ao ensaio com ANL, observou-se uma diminuição significativa (\approx 49%) de danos lipídicos à medida que a concentração de contaminante aumentou, sugerindo que a exposição a ANL parece proteger os organismos do dano oxidativo, eventualmente por estimulação de outras defesas antioxidativas. Pelo contrário, danos oxidativos nos lípidos foram registados anteriormente em góbio comum, exposto a ANL durante 96 horas (Luís e Guilhermino, 2012), favorecendo a hipótese de que os efeitos observados neste trabalho poderão estar relacionados com a ocorrência de vias de detoxificação distintas nos invertebrados. Globalmente, nas condições testadas, a exposição combinada dos organismos aos contaminantes selecionados e variação acentuada de salinidade não provocou danos oxidativos consideráveis nas membranas celulares dos organismos expostos.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Em síntese, neste trabalho observou-se um efeito do ACN nos biomarcadores de neurotransmissão, metabolismo energético, detoxificação e defesas antioxidativas ao fim de uma exposição de sete dias. Efeitos de interação entre ACN e AS foram observados para a atividade das enzimas AChE_g, AChE_m e GST. A exposição à ANL causou alterações nos biomarcadores de neurotransmissão, metabolismo energético, defesas antioxidativas e dano oxidativo. Mas efeitos da sua interação com a AS apenas se registaram para a IDH e a GPx. Tanto para o ACN como para a ANL, com exceção da atividade da AChE_g, as interações observadas foram diferentes (sinergia ou antagonismo) para a exposição a concentrações baixas e concentrações elevadas. No momento da amostragem de tecidos de *C.maenas*, também foi feita a recolha de brânquias. A análise de biomarcadores de biotransformação, defesas antioxidativas (incluindo as enzimas CAT, SOD e GR e a molécula de glutathione) será útil à caracterização do metabolismo destes compostos em crustáceos. Apesar da importância da glândula digestiva no metabolismo e armazenamento de xenobióticos, as brânquias têm sido recomendadas por outros autores (Frasco e Guilhermino, 2002; Maria *et al.*, 2009; Jebali *et al.*, 2011), devido à sua importância, pois são um órgão que está em contacto com a contaminação do meio, sendo desta forma a primeira barreira de defesa contra os poluentes (Frasco e Guilhermino, 2002). De um modo geral, a alteração de salinidade teve maior influência na toxicidade do ACN, relativamente à ANL. As experiências realizadas, representando um cenário de exposição mais realístico, permitiram identificar um stressor natural a ter em consideração na avaliação de risco ambiental para o ACN.

6. Referências

- Aguirre-Martínez, G.V., Del Valls, T.A. and Martín-Díaz, M.L. (2013). Identification of biomarkers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research* 87-88, 1-11
- Amaral, V., Cabral, H.N., Jenkins, S., Hawkins, S. and Paula, J. (2009). Comparing quality of estuarine and nearshore intertidal habitats for *Carcinus maenas*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 83, 219–226
- Bhunja, F., Saha, N.C. and Kaviraj, A. (2002). Effects of aniline- An aromatic amine to some fresh water organisms. *Ecotoxicology* 12, 393- 404
- Bird P. and Draper H. (1984). Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. In: Packer L (ed) *Methods in enzymology*, vol 105. Academic Press, Orlando, 299–305
- Boudou, A., and Ribeyre, F. (1997). Aquatic Ecotoxicology: From the Ecosystem to the Cellular and Molecular Levels. *Environmental Health Perspectives* 105, 21–35
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., and Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 247, 295—311
- Campian, E.C., Cai, J. and Benz, F.W. (2002). Acrylonitrile irreversibly inactivates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by alkylating the catalytically active cysteine 149. *Chemico-Biological Interactions* 140, 279–291
- Campian, E.C. and Benz, F.W. (2008). The acute lethality of acrylonitrile is not due to brain metabolic arrest. *Toxicology* 253, 104–109
- Capela, R., Raimundo, J., Santos, M.M., Caetano, M., Micaelo, C., Vale, C., Guimarães, L. and Reis-Henriques, M.A. (2016). The use of biomarkers as integrative tools for transitional water bodies monitoring in the Water Framework Directive context- A holistic approach in Minho river transitional waters. *Science of the Total Environment*, 539, 85-96
- Carrera, M. P., I. Antolín, V. Martín, R. M. Sainz, J. C. Mayo, F. Herrera, G. García-Santos and Rodríguez, C. (2007). Antioxidants do not prevent acrylonitrile-induced toxicity. *Toxicology Letters* 169, 236-244
- CEDRE, T. C. (2012). Understanding chemical pollution at sea. Learning guide. Brest. Cedre.

CEFAS (2009). Identification of the highest priority HNS and the prediction of their fate, behaviour and effects. Center for Environment Fisheries & Aquaculture Science

CEPA (2000). Priority substances list assessment report. Acrylonitrile. Canadian Environmental Protection Act

CEPA (1994). Priority substances list assessment report. Aniline. Canadian Environmental Protection Act

Chapman, P.M. and Wang, F. (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 3-22

Cieluch, U., Anger, K., Aujoulat, F., Buchholz, F., Charmantier-Daures, M. and Charmantie, G. (2004). Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *The Journal of Experimental Biology* 207, 325–336

Cole, P., Mandel, J.S. and Collins, J.J. (2008). Acrylonitrile and cancer: A review of the epidemiology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 52, 342–351

Commons, D.N., Proni, J.R. and Fergen, R.E. (1996). Coastal Oceanographic characteristics and their impact on marine effluents biotoxicity studies during the SEFLOE II project; In: LaPoint, T.W., Price, F.T. and Little, E.E. *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. 4th Volume.

Costa, S. and Guilhermino, L. (2015). Influence of long-term exposure to background pollution on the response and recovery of the invasive species *Corbicula fluminea* to ammonia sub-lethal stress: A multi-marker approach with field estuarine populations. *Water, Air, and Soil Pollution* 226, 95

Crothers, J.H. (1967). The biology of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). I. The background—atomy, growth and life history. *Field Studies* 2, 407–434

Cunha, I., Neuparth, T., Moreira, S., Santos, M. and Reis-Henriques, M.A. (2014). Management of contaminated marine marketable resources after oil and HNS spills in Europe. *Journal of Environmental Management* 135, 36-44

Cunha, I., Moreira, S. and Santos, M.M. (2015). Review on hazardous and noxious substances (HNS) involved in marine spill incidents— An online database. *Journal of Hazardous Materials* 285, 509-516

De Coninck, D.I.M., De Schamphelaere, K.A.C., Jansen, M., De Meester, L. and Janssen, C.R. (2013). Interactive effects of a bacterial parasite and the insecticide carbaryl to life-history and physiology of two *Daphnia magna* clones differing in carbaryl sensitivity. *Aquatic Toxicology* 130–131, 149–159

de los Santos, C.B., Neuparth, T., Torres, T., Martins, I., Cunha, I., Sheahan, D., McGowan, T. and Santos, M.M. (2015). Ecological modelling and toxicity data coupled to

assess population recovery of marine amphipod *Gammarus locusta*: Application to disturbance by chronic exposure to aniline. *Aquatic Toxicology* 163, 60–70

Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M. and Guilhermino, L. (2001) Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere* 45, 553–560

Ellis, G. and Goldberg, D. M. (1971). An improved manual and semi-automatic assay for NADP- dependent isocitrate dehydrogenase activity, with a description of some kinetic properties of human liver and serum enzyme. *Clinical Biochemistry* 2, 175–185

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres jr, V., R.M. Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95

Esmat, A., El-Demerdash, E., El-Mesallamy, H. and Abdel-Naim, A.B. (2007). Toxicity and oxidative stress of acrylonitrile in rat primary glial cells: Preventive effects of *N*-acetylcysteine. *Toxicology Letters* 171, 111–118.

EURAR (2004a). European Union risk assessment report: Acrylonitrile. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau 32

EURAR (2004b). European Union risk assessment report: Aniline. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau 50

Ferreira, J.C., Simas, T., Nobre, A., Silva, M.C., Shifferegger, K. and Lencart-Silva, J. (2003). Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal Portuguese systems- application of the United States National Eutrophication Assessment to the Minho, Lima, Douro, Ria de Aveiro, Mondego, Tagus, Sado, Mira, Ria Formosa and Guadiana Systems. Instituto da Água and Institute of Marine Research, Lisboa.

Fournier, D., Bride, J.M., Poirei, M., Berge, J.B. and Plapp, F.W. (1992). Insect Glutathione S- Transferases. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 1840-1845

Frasco, M.F. and Guilhermino, L. (2002). Effects of dimethoate and beta naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 149-156

Frasco, M.F., Fournier D., Carvalho F. and Guilhermino, L. (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 10, 360-375

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., and Depledge, M.H. (2004). A Multibiomarker Approach To Environmental Assessment. *Environmental Science and Technology* 38, 1723-1731

Ghanayem, B.I., Farooqui, M.Y.H., Elshabrawy, O., Mumtaz, M.M. and Ahmed, E.A. (1991). Assessment of the acute acrylonitrile-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 13, 499–502

Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A. and Soares, A.M.V.M. (2000). In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Science of the Total Environment* 247, 137-141

Guimarães, L., Medina, M.H. and Guilhermino, L. (2012). Health status of *Pomatoschistus microps* populations in relation to pollution and natural stressors: implications for ecological risk assessment. *Biomarkers* 17, 62-77

Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139

Hamada, F.M., Abdel-Aziz, A.H., Abd-Allah, A.R. and Ahmed, A.E. (1998). Possible functional immunotoxicity of acrylonitrile (VCN). *Pharmacological Research*, 37, No. 2

Henry, R.P., Gehnrich, S., Weihrauch D. and Towle, D.W. (2003) Salinity mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 136, 243–258

Heugens, E.H.W., Hendriks, A.J., Dekker, T., Straalen, N.M.V., and Admiraal, W. (2001). A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 31, 247—284

Hosoda, S., Suga, T., Shikama, N., and Mizuno, K. (2009). Global surface layer salinity change detected by Argo and its implication for hydrological cycle intensification. *Journal of Oceanography* 65, 579-586

IARC (1999). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 71- Acrylonitrile. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer

IMO – International Maritime Organisation. (2000). Protocol on Preparedness, Response and Co-operation to Pollution Incidents by Hazardous and Noxious Substances (OPRC-HNS Protocol).

IPCC (2014). Climate change 2014: Impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Yokohama.

ITOPF (2010). About HNS: <http://www.itopf.com/marine-spills/about-hns/> visto em 25 de Julho de 2015.

ITOPF (2011). Technical information paper- TIP 17: Response to marine chemical incidents. The International Tanker Owners Pollution Federation

Jebali, J., Ben-Khedher, S., Ghedira, J., Kamel, N. and Bousseta, H. (2011). Integrated assessment of biochemical responses in Mediterranean crab (*Carcinus maenas*) collected from Monastir Bay, Tunisia. *Journal of Environmental Sciences* 23, 1714–1720

Jillette, N., Cammack, L., Lowenstein, M. and Henry, R.P. (2011). Down-regulation of activity and expression of three transport-related proteins in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to high salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 158, 189–193

Jo, S.H., Son, M.K., Koh, H.J., Lee, S.M., Song, I.H., Kim, Y.O., Lee, Y.S., Jeong, K.S., Kim, W.B., Park, J.W., Song, B.J. and Huhe, T.L. (2001). Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 16168–16176

Kahl, T., Kai-Wilfrid Schröder Lawrence F.R., Marshall W.J., Höke, H. and Jäckh, R. (2005). Aniline. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*

Kedderis, G.L. and Batra, R. (1993). Species differences in the hydrolysis of 2-cyanoethylene oxide, the epoxide metabolite of acrylonitrile. *Carcinogenesis* 14, 685-689

Kennish, M.J. (2002). Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental Conservation*, 29, 78–107

Kirby, M.F. and Law, R.J. (2010). Accidental spills at sea – Risk, impact, mitigation and the need for co-ordinated post-incident monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 60, 797–803

Klassen, G. and Locke, A. (2007). A biological synopsis of the European green crab, *Carcinus maenas*, Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2818 Can. 75.

Klaassen, C.D. (2008). Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 7th Edition

Levinton, J., Doall, M., Ralston, D., Starke, A. and Allam, B. (2011). Climate change, precipitation and impacts on estuarine refuge from disease. *Plos One* 6, 1-8

Lima, I., Moreira, S. M., Rendón-Von Osten, J., Soares, A. M. V. M. and Guilhermino, L. (2007). Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere* 66, 1230-1242

Luís, L.R. and Guilhermino, L. (2012). Effects of aniline on marine organisms: Comparison of biomarkers responses in common goby (*Pomatoschistus microps*) and the common prawn (*Palaemon serratus*). 28th Congress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 163, 19.

Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101,13–30

Mamaca, E., Girin, M., Le Floch, S. and Zir, R. (2009). Review of Chemical Spills at Sea and Lessons Learnt. In A Technical Appendix to the INTERSPILL 2009

Maria, V.L., Santos, M. A. and Bebianno, M.J. (2009). Contaminant effects in shore crabs (*Carcinus maenas*) from Ria Formosa Lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150, 196–208

Martínez-Gómez, C., Vethaak, A.D., Hylland, K., Burgeot, T., Köhler, A., Lyons, B.P., Thain, J., Gubbins, M.J. and Davies, I.M.(2010). A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 67, 1105–1118

Menezes, S., Soares, A., Guilhermino, L. and Peck, M.R. (2006) Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 335, 114–122

Mesquita, S. (2010). Testing the potential of chitobiase activity of *Carcinus maenas* as a biomarker in environmental studies. Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais from the Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar and Faculdade de Ciência da Universidade do Porto.

Mesquita, S.R., Guilhermino, L. and Guimarães, L. (2011). Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere* 85, 967–976

Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S. and Tiller, D.J. (1984). Differential distribution of glutathione and glutathione- related enzymes in rabbit kidney: possible implications in analgesic nephropathy. *Biochemical Pharmacology* 33, 1801-1807

Monserat, J.M., Geracitano, L.A. and Bianchini, A. (2004). Current and Future Perspectives Using Biomarkers to Assess Pollution in Aquatic Ecosystems. *Comments on Toxicology* 9, 255–269

Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L. and Ribeiro, R. (2006). An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. *Environmental Pollution* 139, 318-329

Neuparth, T., Moreira, S., Santos, M. and Reis-Henriques, M.A. (2010). ARCOPOL Activity 6 Task 6.2.1. Identify chemicals that pose major environmental risk. CIIMAR

Neuparth, T., Moreira, S., Santos, M.M. and Reis-Henriques, M.A. (2011). Hazardous and Noxious Substances (HNS) in the marine environment: Prioritizing HNS that pose major risk in a European context. *Marine Pollution Bulletin* 62, 21-28

Neuparth, T., Capela, R., Rey-Salgueiro, L., Moreira, S. M., Santos, M.M. and Reis-Henriques, M. A. (2013). Simulation of a hazardous and noxious substances (HNS) spill in the marine environment: lethal and sublethal effects of acrylonitrile to the European seabass. *Chemosphere* 93, 978-985

Neuparth, T., Capela, R., Pereira, S.P.P., Moreira, S.M., Santos and M., Reis-Henriques, M.A. (2014). Toxicity Effects of Hazardous and Noxious Substances (HNS) to Marine Organisms: Acute and Chronic Toxicity of p-Xylene to the Amphipod *Gammarus locusta*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77, 1210–1221

NYTIMES, 2013: http://www.nytimes.com/2013/03/03/world/asia/spill-in-china-lays-bare-environmental-concerns.html?_r=0 visto em 18 de Agosto de 2015

Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358

Olson, Kent R. (2007). *Poisoning & drug overdose* (5th Ed.). New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill.

Pereira, E., Abreu, S. N., Coelho, J. P., Lopes, C. B., Pardal, M. A., Vale, C. and Duarte, A. C. (2006). Seasonal fluctuations of tissue mercury contents in the European shore crab *Carcinus maenas* from low and high contamination areas (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine Pollution Bulletin*.52, 1450-1457

Rocha, A.C.S., Reis-Henriques, M.A., Galhano, V., Ferreira, M. and Guimarães, L. (submetido). Toxicity of seven priority hazardous and noxious substances (HNS) to marine organisms: current status, knowledge gaps and recommendations for future research.

Rodrigues, A.P., Oliveira, P.C., Guilhermino, L., and Guimarães, L. (2012). Effects of salinity stress on neurotransmission, energy metabolism, anti-oxidant biomarkers of *Carcinus maenas* from two estuaries of the NW Iberian Peninsula. *Marine Biology* 159, 2061—2074

Rodrigues, A.P., Gravato, C. and Guimarães, L. (2013). Involvement of the antioxidant system in differential sensitivity of *Carcinus maenas* to fenitrothion exposure. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15, 1938–1948

Rodrigues, A.P., Santos, L.H.M.L.M., Oliva-Teles, M.T., Delerue-Matos, C. and Guimarães, L. (2014a). Joint effects of salinity and the antidepressant sertraline on the estuarine decapod *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology* 156, 169-178

Rodrigues, A.P., Oliva-Teles, T., Mesquita, S.R., Delerue-Matos, C. and Guimarães, L. (2014b). Integrated biomarker responses of an estuarine invertebrate to high abiotic stress and decreased metal contamination. *Marine Environmental Research* 101, 101-114

Rodrigues, E.T. and Pardal, M.A. (2014). The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environment International* 70, 158–182

Rodrigues, A.P., Santos, L.H.M.L.M., Ramalhos, M.J., Delerue-Matos, C. and Guimarães, L. (2015). Sertraline accumulation and effects in the estuarine decapod

Carcinus maenas: Importance of the history of exposure to chemical stress. *Journal of Hazardous Materials* 283, 350–358

Santos, S., Vilar, V.J.P., Alves, P., Boaventura, R.A.R. and Botelho, C. (2013). Water quality in Minho/Miño River (Portugal/Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 3269-3281

SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks), SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), 2013. Addressing the New Challenges for Risk Assessment.

Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., von Gunten, U. and Wehrli, B. (2006). The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science (New York, N.Y.)* 313, 1072-1077

Sorenson, A.L. (1973) Demonstration of an action of acetylcholine on the central nervous system of a crab. *The Biological Bulletin* 144, 180–191

Towle, D.W. (1997) Molecular approaches to understanding salinity adaptation of estuarine animals. *American Zoologist* 37, 575–584

Turja, R., Guimarães, L., Nevala, A., Kankaanpää, H., Korpinen, S. and Lehtonen, K.K. (2014). Cumulative effects of exposure to cyanobacteria bloom extracts and benzo(a)pyrene on antioxidant defence biomarkers in *Gammarus oceanicus* (Crustacea: Amphipoda). *Toxicon* 78, 68–77

van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–159

van Herwijnen, R. (2009). Environmental risk limits for acrylonitrile. RIVM- National Institute for Public Health and the Environment.

van Vlaardingen, P.L.A., de Poorter, L.R.M., Fleuren, R.H.L.J., Janssen, P.J.C.M., Pstuma-Doodeman, C.J.A.M., Verbruggen, E.M.J. and Vos, J.H. (2007). Environmental risk limits for twelve substances, prioritised on the basis of indicative risk limits. RIVM- National Institute for Public Health and the Environment.

Vassault, A. (1983). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York

Watcharasit, P., Suntararuks, S., Visitnonthachai, D., Thiantanawat, A. and Satayavivad, J. (2010). Acrylonitrile induced apoptosis via oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cell. *Journal of Applied Toxicology* 30, 649–655

WHO (2002). Concise International Chemical Assessment Document 39. Acrylonitrile. World Health Organization

Yuanqing, H., Suhua, W., Guangwei, X., Chunlan, R., Hai, Q., Wenrong, X., Rongzhu, L., Aschner, M. and Milatovic, D. (2013). Acrylonitrile has distinct hermetic

effects on acetylcholinesterase activity in mouse brain and blood that are modulated by ethanol. Dose-Response 11, 49-59